

2-Substituierte Indol-3-carbonitrile als neue Inhibitoren der Proteinkinase DYRK1A

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Rosanna Stefanie Daniela Meine
aus Hameln

1. Referent: Professor Dr. Conrad Kunick
2. Referent: Professor Dr. Knut Baumann
eingereicht am: 10.01.2018
mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.04.2018

Druckjahr 2018

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Meine, R., Falke, H., Kötz, J., Schweda, S.I., Kunick, C.: 7-Iodo-1*H*-indole-3-carbonitrile. *Molbank* **2015**, M869.

Meine, R., Blech, M., Lindhof, J., Kunick, C.: 7-Bromo-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indole-3-carbonitrile. *Molbank* **2017**, M941.

Tagungsbeiträge

Meine, R., Loaëc, N., Meijer, L., Kunick, C.: 2-Substituted indole-3-carbonitriles as new DYRK inhibitors (Vortrag). Konferenz "DYRK1A, related kinases and human disease", Saint Malo, Frankreich, 28.03. – 01.04.2017.

Meine, R., Loaëc, N., Meijer, L., Kunick, C.: 2-Substituted indole-3-carbonitriles as new inhibitors of the protein kinase DYRK1A with improved physicochemical properties (Poster). 2nd Braunschweig International Symposium on Pharmaceutical Engineering Research (SPhERe), Braunschweig, 06.09. – 08.09.2017.

Meine, R., Loaëc, N., Meijer, L., Kunick, C.: 2-Substituted indole-3-carbonitriles as new DYRK1A inhibitors (Poster). DPhG Jahrestagung, Saarbrücken, 26.09. – 29.09.2017.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2015 bis Januar 2018 am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,

dem ich für die Überlassung des spannenden Themas, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die schöne Zeit in seinem Arbeitskreis herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Knut Baumann

für die Übernahme des Koreferats.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 ALZHEIMER-DEMENZ UND DOWN-SYNDROM	1
1.2 DIE PROTEINKINASE DYRK1A	2
1.2.1 AUFBAU UND STRUKTUR	3
1.2.2 FUNKTION	6
1.2.3 INHIBITOREN	7
1.3 VERWANDTE KINASEN: DYRK1B UND CLK1	14
1.4 HALOGENBINDUNGEN	16
1.5 PHYSIKOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON WIRKSTOFFKANDIDATEN	18
1.5.1 LE UND LLE	18
1.5.2 LÖSLICHKEIT	19
1.6 AUFGABENSTELLUNG	20
2 RATIONALES WIRKSTOFFDESIGN	23
2.1 BINDEMEDI AUSGEWÄHLTER DYRK1A-INHIBITOREN	24
2.2 REDOCKING	28
2.3 BINDEMODUS VON KUFA194	31
2.4 BINDEMODUS DER INDOL-3-CARBONITRILE IN DYRK1A	34
2.5 DOCKING IN VERWANDTE KINASEN	44
3 SYNTHESE	46
3.1 SYNTHESE DER 2-SUBSTITUIERTEN INDOLE	46
3.1.1 SYNTHESE VON 3-SUBSTITUIERTEN 1-(2-AMINOPHENYL)-2-CHLORETHAN-1-ONEN	46
3.1.2 DARSTELLUNG VON 2-SUBSTITUIERTEN INDOLEN	48
3.2 EINFÜHRUNG VON SUBSTITUENTEN AM INDOLSTICKSTOFF	51
3.3 SYNTHESE DER ENDSTUFEN	53
3.3.1 EINFÜHRUNG DER NITRILGRUPPE	53

3.3.2	SYNTHESE VON POLAREN DERIVATEN DER 7-HALOGENINDOL-3-CARBONITRILE	64
4	BIOLOGISCHE AKTIVITÄT	69
4.1	KINASEINHIBITORISCHE AKTIVITÄT	69
4.2	AKTIVITÄT IN ZELLULÄREN ASSAYS	80
4.3	ZYTOTOXIZITÄT	83
5	PHYSIKOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN	85
5.1	BESTIMMUNG DER LÖSLICHKEIT	90
6	ZUSAMMENFASSUNG	95
7	SUMMARY	97
8	EXPERIMENTELLER TEIL	99
8.1	GERÄTE UND METHODEN	99
8.1.1	LÖSUNGSMITTEL	103
8.2	SYNTHESEN UND ANALYTISCHE DATEN	104
8.3	MOLEKULARES DOCKING	176
8.4	PROTEINKINASEASSAYS	176
8.5	ZELLBASIERTE ASSAYS ZUR BESTIMMUNG DER DYRK1A-INHIBITION	182
8.6	ZYTOTOXIZITÄTSASSAY	182
8.7	VORHERSAGE DER PHYSIKOCHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN	184
8.8	LÖSLICHKEITSUNTERSUCHUNGEN	184
8.8.1	THERMODYNAMISCHE LÖSLICHKEIT	184
8.8.2	KINETISCHE LÖSLICHKEIT	185
9	VERZEICHNISSE	186
9.1	TABELLENVERZEICHNIS	186
9.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	187
9.3	SCHEMATAVERZEICHNIS	189

<u>10</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>191</u>
------------------	------------------------------------	-------------------

Abkürzungsverzeichnis

aliph.	aliphatisch	HEK	<i>human embryonic kidney</i>
AAV	Allgemeine Arbeitsanweisung	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ACN	Acetonitril	IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion	INDY	<i>inhibitor of dyrk</i>
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>	isokr.	isokratisch
APP	Amyloid-Precursor-Protein	J	Kopplungskonstante
ArH	aromatisches Proton	konz.	konzentriert
ASAP	<i>atmospheric solids analysis probe</i>	LE	<i>ligand efficiency</i>
ASF	<i>alternative splicing factor</i>	LLE	<i>ligand-lipophilicity efficiency</i>
ATP	Adenosintriphosphat	[M] ⁺	Molekülion
AUC	<i>area under the curve</i>	[M] ⁺⁺	Molekülradikalkation
Aβ	β-Amyloidpeptid	m	Multipllett
ber.	berechnet	m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>	MAO-A	Monoaminoxidase A
CHN	elementare Zusammensetzung	MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
CK2	<i>casein kinase 2</i>	MRD7	<i>mental retardation, autosomal dominant 7</i>
CLK	<i>CDC-2 like kinase</i>	MS	Massenspektrometrie
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>	NCI	<i>National Cancer Institute</i>
d	Dublett	NCTS	<i>N-Cyan-N-phenyl-p-toluensulfonamid</i>
d ₆ -DMSO	deutერიertes DMSO	NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
DAD	<i>diode array detector</i>	NLS	<i>nuclear localization signal</i>
DANDY	<i>diaryl-azaindole inhibitors of DYRK1A</i>	NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
DC	Dünnschichtchromatographie	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
DEPT	<i>distorsionless enhancement by polarization transfer</i>	PDB	<i>Protein data bank</i>
DH	<i>dyrk homology</i>	ppm	<i>parts per million</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	PS1	Presenilin-1
DMF	Dimethylformamid	q	Quartett
DMSO	Dimethylsulfoxid	RCAN1	<i>regulator of calcineurin 1</i>
DS	Down-Syndrom	RMSD	<i>root mean square deviation</i>
DSCR	<i>Down syndrome critical region</i>	RNU	<i>relative nephelometric unit</i>
DYRK	<i>dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase</i>	rpm	<i>revolutions per minute</i>
EGCG	Epigallocatechingallat	RT	Raumtemperatur
EI	Elektronenstoßionisation	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Fsp ³	Anteil der sp ³ -hybridisierten Kohlenstoffatome	SEM	<i>standard error of the mean</i>
FT-IR	Fourier Transformation-Infrarotspektroskopie	SF3B1	<i>splicing factor 3B1</i>
GA	Genetischer Algorhythmus	Smp.	Schmelztemperatur
gef.	gefunden	STD	Standardabweichung
gk	<i>gatekeeper</i>	THF	Tetrahydrofuran
GOLD	<i>Genetic optimisation for ligand docking</i>	TMS	Tetramethylsilan
GSK-3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>	Zers.	Zersetzung
GST	Glutathion-S-Transferase	λ _{max}	Absorptionsmaximum
HA	Anzahl der Nichtwasserstoffatome		

1 Einleitung

1.1 Alzheimer-Demenz und Down-Syndrom

Die Alzheimer-Demenz ist mit einem Anteil von 70-80 % die häufigste Form der Demenzerkrankungen.¹ Schon heute sind weltweit etwa 47 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen und aufgrund der steigenden Lebenserwartung wird sich diese Zahl vermutlich etwa alle 20 Jahre verdoppeln.² Die Anzahl der Erkrankten nimmt mit fortgeschrittenem Alter drastisch zu. Während in Europa nur 0.6 % der 60- bis 64-Jährigen an Demenz erkrankt sind, beträgt die Prävalenz bei den über 95-Jährigen 46.3 %.³ Die Krankheit zeichnet sich durch einen langsam fortschreitenden Verlust des Kurzzeitgedächtnisses und weiterer kognitiver Fähigkeiten aus, was im späteren Verlauf auch die Selbstständigkeit der Patienten beeinträchtigt.¹ Pathophysiologisch werden verschiedene Theorien zur Entstehung der Symptomatik diskutiert. β -Amyloid-Ablagerungen sind der Hauptbestandteil von extrazellulären senilen Plaques, die im Gehirn von Alzheimerpatienten gefunden wurden und toxisch auf Neuronen wirken.^{4, 5} β -Amyloidpeptide ($A\beta$) entstehen durch die sequentielle Spaltung des transmembranären Amyloid-Precursor-Proteins (APP) durch die β - und γ -Sekretase. Im Gegensatz dazu wird APP bei Gesunden weitgehend durch die α -Sekretase in das lösliche APP α -Protein und das APP-C-terminale Fragment CTF83 gespalten, die untoxisch sind.⁶⁻⁸

Darüber hinaus kommt es zur intrazellulären Ablagerung von neurofibrillären Bündeln, die aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen und auch zum Untergang von Neuronen führen. Das Tau-Protein bindet an Mikrotubuli des Cytoskeletts und ist wichtig für deren Zusammenbau und Stabilität. Durch die Hyperphosphorylierung verliert es seine Funktion und lagert sich zu unlöslichen Aggregaten zusammen.⁸⁻¹⁰

Des Weiteren spielen vermutlich auch ein Mangel des Neurotransmitters Acetylcholin und eine erhöhte Konzentration von Glutamat und daraus folgend eine erhöhte Aktivität der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren eine Rolle.⁵ Die Therapie der Alzheimer-Krankheit ist noch immer nur eingeschränkt möglich und führt nur zu einer Verzögerung des Krankheitsverlaufes, nicht jedoch zur Heilung. Zur Behandlung werden Acetylcholinesteraseinhibitoren (z.B. Rivastigmin) und der NMDA-Rezeptorantagonist Memantin eingesetzt, deren Wirkung aber eher gering und auf das frühe Krankheitsstadium begrenzt ist.^{2, 4, 11} Es befinden sich allerdings einige Substanzen in klinischen Studien, die vor allem darauf zielen, die Entstehung der β -Amyloidplaques zu verhindern.¹ Mit Tideglusib hat allerdings auch ein irreversib-

ler GSK-3 β -Inhibitor, der eine Tau-Protein phosphorylierende Kinase hemmt, Phase II-Studien beendet. Dabei konnten die zunächst beobachteten positiven kognitiven Effekte aber nicht bestätigt werden.^{12, 13}

Das Down-Syndrom (DS) tritt bei etwa einer von 700 bis 800 Geburten auf und ist damit eine der häufigsten genetischen Ursachen für eine geistige Behinderung.^{14, 15} Beim Down-Syndrom liegt das Chromosom 21 in dreifacher Kopie vor, weshalb auch von Trisomie 21 gesprochen wird. An der Ausbildung der phänotypischen Merkmale des Down-Syndroms sind allerdings etwa nur ein Drittel der Gene des Chromosoms 21 beteiligt. Diese Gene werden überexprimiert und liegen überwiegend in der sogenannten *Down syndrome critical region* (DSCR) vor.^{15–17} Die bei Menschen mit DS beobachteten Symptome sind sehr divers und treten häufig nur bei einem Teil der Betroffenen auf. Alle Betroffenen zeigen kognitive Einschränkungen und Muskelhypertonie. Häufig werden auch angeborene Herzfehler oder eine Brachyzephalie beobachtet.^{16, 18} Darüber hinaus entwickeln alle Betroffenen ab etwa dem 35. Lebensjahr die für die Alzheimer-Demenz typischen neuropathologischen Veränderungen. Es kommt zur Bildung von neurofibrillären Bündeln und zur Ablagerung von β -Amyloid-Plaques im Gehirn. Daher entwickeln DS-Individuen überproportional häufig eine Demenzsymptomatik. Dabei liegt der Krankheitsbeginn etwa 20 Jahre früher im Vergleich zur restlichen Bevölkerung, sodass bereits etwa 32 % der 55- bis 59-Jährigen eine Demenz zeigen.^{19–21}

Ursächlich für das frühe Auftreten der für Alzheimer typischen Veränderungen im Gehirn ist vermutlich eine Überexpression von APP, dessen Gen in der DSCR des Chromosoms 21 lokalisiert ist. Dadurch kommt es zur vermehrten Bildung der β -Amyloidpeptide. Aber auch die Proteinkinase DYRK1A, deren Gen ebenfalls in der DSCR liegt, scheint an der frühen Entwicklung der neurodegenerativen Veränderungen und darüber hinaus auch an den weiteren kognitiven Symptomen beteiligt zu sein.²²

1.2 Die Proteinkinase DYRK1A

Proteinkinasen sind Transferasen, die die γ -Phosphatgruppe von ATP auf Hydroxylgruppen der Aminosäuren ihrer Substrate übertragen. Durch die Phosphorylierung ihrer Substrate sind sie an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Vorgängen, wie z.B. Proliferation, Differenzierung oder Apoptose, beteiligt.²³

Die Proteinkinase DYRK1A gehört zur Familie der *dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases* (DYRK). Die DYRK-Kinasen werden der CMGC-Gruppe zugeordnet, die darüber hinaus *cyclin-dependent kinases* (CDKs), *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), *glycogen synthase kinases* (GSKs) und *CDK-like kinases* (CLKs) enthält.²⁴ Die DYRK-Familie umfasst fünf Kinasen, die in zwei Klassen aufgeteilt werden: DYRK1A und DYRK1B bilden die Klasse 1 und die Klasse 2 besteht aus DYRK2, DYRK3 und DYRK4.²⁵ Proteinkinasen werden je nachdem, ob sie die aliphatischen Aminosäuren Serin und Threonin oder die aromatische Aminosäure Tyrosin phosphorylieren, in Serin-/Threonin-Kinasen oder Tyrosin-Kinasen unterschieden.²⁶ Wie im Namen erwähnt, weisen DYRKs eine duale Spezifität auf und phosphorylieren sowohl Serin-, Threonin- als auch Tyrosinreste, wobei die Tyrosinkinaseaktivität auf die Autophosphorylierung begrenzt ist.²⁷

1.2.1 Aufbau und Struktur

DYRK1A enthält die katalytische Domäne mit dem für alle Kinasen typischen Aufbau. Diese Kinasedomäne wird N-terminal überwiegend aus β -Faltblättern und C-terminal aus α -Helices geformt. Die N-terminale und C-terminale Domäne sind über die flexible *hinge*-Region miteinander verbunden, an der sich die ATP-Bindetasche ausbildet und sich damit das aktive Zentrum der Kinase befindet. Die *hinge*-Region ist an der Bindung des ATPs beteiligt und bildet zwei Wasserstoffbrücken zu dessen Adeninring aus. Den Anfang der *hinge*-Region bildet bei DYRK1A N-terminal die Aminosäure Phe238, der sogenannte *gatekeeper* (*gk*), der im Allgemeinen den Zugang und die Größe einer *hydrophobic back pocket* reguliert, die nicht vom ATP besetzt wird. Aufgrund der großen Seitenkette des Phenylalanins ist diese zusätzliche Tasche in DYRK1A allerdings nicht vorhanden.²³ Weitere konservierte Strukturmerkmale, die auch in DYRK1A zu finden sind, sind die Glycin-reiche Schleife mit der allgemeinen Sequenz GxGxxGxV, das konservierte Lys188 und das konservierte Glu203 der α C-Helix, die wichtig für die Bindung der Phosphatreste des ATPs sind.^{28–31} Eine weitere konservierte Sequenz ist das DFG-Motiv, das von den Aminosäuren Aspartat (D), Phenylalanin (F) und Glycin (G) gebildet wird und N-terminal den Beginn der Aktivierungsschleife darstellt. Das Aspartat des DFG-Motivs komplexiert ein Magnesiumkation, das wiederum mit dem β - und γ -Phosphat des ATPs interagiert.^{28, 32} Die Aktivität von Kinasen wird in der Regel durch die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten dieser Aktivierungsschleife reguliert. Durch ionische Wechselwirkungen mit der Argininseitenkette des konservierten HRD-Motivs (Histidin (H)-Arginin (R)-Aspartat (D)) der katalytischen Schleife wird die aktive Kon-

formation, die auch als *DFG-in* bezeichnet wird, stabilisiert. Durch Dephosphorylierung dieses Restes entsteht entsprechend eine inaktive Konformation, die *DFG-out* Konformation.^{24, 33} In der Aktivierungsschleife von DYRK1A befindet sich die bei allen DYRK-Kinasen hochkonservierte YxY-Sequenz, die dem TxY-Motiv der MAP-Kinasen entspricht und dort wichtig für die Aktivität ist. Der zweite Tyrosinrest (Tyr321) des YxY-Motivs wird bereits während der Translation autophosphoryliert, was zur konstitutiven Aktivierung von DYRK1A führt. In DYRK1A ist das konservierte Arginin (R) des HRD-Motivs der katalytischen Schleife allerdings gegen ein Cystein (C) ausgetauscht, sodass sich ein HCD-Motiv ergibt. Daher bildet pTyr321 vermutlich Salzbrücken zu Arg325 und Arg328 aus und stabilisiert so die aktive Konformation.^{24, 30} Allerdings wird die DYRK1A-Aktivität auch nach posttranslationaler Dephosphorylierung von pTyr321 aufrechterhalten.³⁴ Der Austausch von Tyr321 gegen Phenylalanin, Histidin oder Glutamat dagegen führt zum Verlust bzw. Rückgang der Kinaseaktivität.^{34, 35} Damit scheint Tyr321 wichtig für die Aktivierung von DYRK1A, aber nicht für die Aufrechterhaltung der Kinaseaktivität zu sein.

Aufgrund der dauerhaften Aktivität von DYRK1A müssen andere Mechanismen als die bei anderen Kinasen beobachtete Dephosphorylierung von Aminosäuren der Aktivierungsschleife für die Regulation vorliegen. Die Co-Kristallstruktur von DYRK1A mit dem Inhibitor PKC412 (PDB: 4NCT)³⁶ zeigt eine Disulfidbrücke zwischen Cys286 des HCD-Motivs der katalytischen Schleife und Cys312. Daher ist die Veränderung des Redoxstatus eventuell eine Möglichkeit für die Regulation der DYRK1A-Aktivität.^{24, 36} Außerdem wird die Aktivität möglicherweise schon durch die Regulation der Transkription und durch die Bindung von Proteinen kontrolliert.²⁴

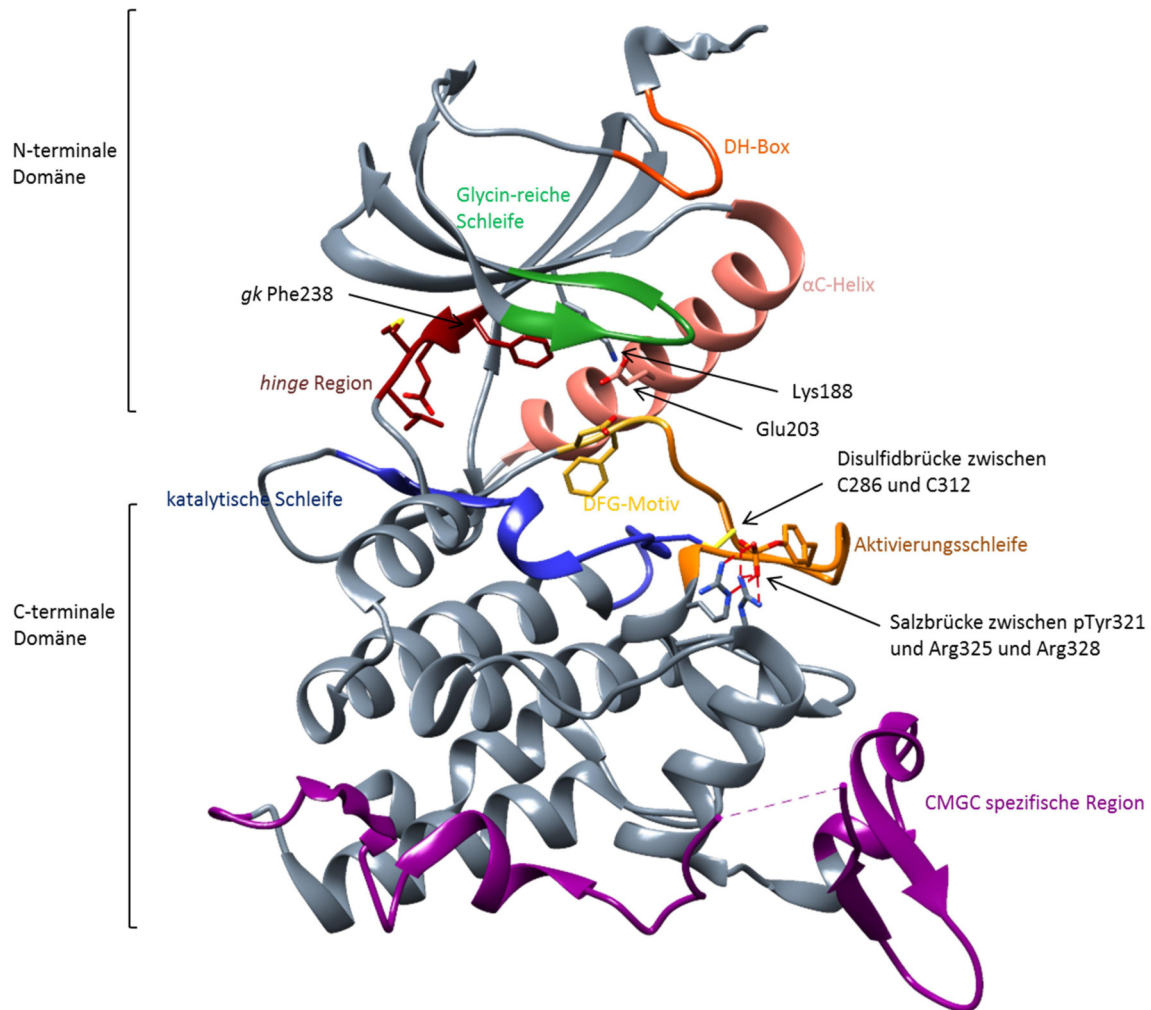


Abbildung 1-1: Aufbau der Proteinkinase DYRK1A mit Kennzeichnung der charakteristischen strukturellen Eigenschaften (PDB: 4NCT³⁶).

Neben den in allen Kinasen konservierten Bereichen enthält DYRK1A noch weitere spezifische Strukturelemente. N-terminal befindet sich direkt vor der katalytischen Domäne die *dyrk homology* (DH) Box, deren Sequenz $DDDNxDY$ in allen DYRKs vorhanden ist. Außerdem befindet sich bei den DYRK-Kinasen der Klasse 1 außerhalb der katalytischen Domäne N-terminal ein konserviertes *nuclear localization signal* (NLS), das für die Lokalisation im Zellkern verantwortlich ist, und in der C-terminalen Region das PEST-Motiv, eine Region, die viele Prolin (P)-, Glutamat (E)-, Serin (S)- und Threoninreste (T) enthält.^{27, 30, 37} Alle Kinasen der CMGC-Gruppe enthalten außerdem eine zusätzliche Sequenz in der C-terminalen Domäne, die als *CMGC insert* bezeichnet wird.²⁹ Die Struktur der Kinase mit allen charakteristischen Eigenschaften ist in Abbildung 1-1 dargestellt.

1.2.2 Funktion

Beim Menschen ist das Gen von DYRK1A in der DSCR auf Chromosom 21 lokalisiert. Bei Individuen mit DS liegt dieses Chromosom in dreifacher Kopie vor, weshalb auch von Trisomie 21 gesprochen wird. Im Gehirn von Menschen mit DS konnte daher auch eine Überexpression der DYRK1A beobachtet werden.³⁸ Diese Überexpression von DYRK1A wird in Zusammenhang mit den kognitiven Symptomen des DS gebracht, da transgene Mäuse, die DYRK1A überexprimieren (TgDYRK1A-Maus), vergleichbare geistige Einschränkungen aufwiesen.³⁹ DYRK1A phosphoryliert diverse *targets*, darunter Transkriptions- und Translationsfaktoren, *splicing*-Faktoren, synaptische Proteine und Proteine des Zytoskeletts.^{40, 41} Damit spielt sie unter anderem eine wichtige Rolle für die Proliferation und Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen und damit für die Entwicklung des Gehirns. Durch die Überexpression werden diese Vorgänge gestört, was vermutlich zu einer verringerten Proliferation und verfrühten Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen führt. Dies bedingt insgesamt eine verminderte Anzahl an Neuronen und damit ein verkleinertes Gehirn und kognitive Einschränkungen.^{38, 42}

Gleichzeitig führt aber auch eine verminderte Expression von DYRK1A zu ähnlichen Symptomen. Bei Patienten mit MRD7 (*mental retardation, autosomal dominant 7*) kommt es zu einer heterozygoten Mutation im DYRK1A-Gen und damit zu einer verminderten Aktivität. Diese Patienten zeigen eine geistige Behinderung, autistische Verhaltensweisen und eine Mikrozephalie. Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivität von DYRK1A streng reguliert ist.^{41, 43–45}

Außerdem ist bekannt, dass DYRK1A einige Proteine phosphoryliert, die an der Bildung von intrazellulären neurofibrillären Bündeln und extrazellulären β -Amyloid-Plaques beteiligt sind. Damit ist die DYRK1A-Überexpression eventuell eine Ursache für das frühe Auftreten der Alzheimer-Symptomatik bei Menschen mit DS.⁴⁶ DYRK1A phosphoryliert das Tau-Protein an elf verschiedenen Positionen und agiert außerdem als sogenannte *priming kinase* für GSK-3 β . Die vorherige Phosphorylierung von Tau durch DYRK1A erleichtert die Phosphorylierung an weiteren Positionen durch die GSK-3 β . Damit führt eine erhöhte Expression von DYRK1A zu hyperphosphoryliertem Tau-Protein, das seine Funktion verliert und sich zu neurofibrillären Bündeln zusammen lagert.^{40, 47, 48} Des Weiteren phosphoryliert DYRK1A auch den *regulator of calcineurin 1* (RCAN1), wodurch dessen inhibitorische Wirkung auf die Phosphatase Calcineurin verstärkt wird. Auch dies begünstigt die Bildung von hyperphosphoryliertem Tau,

da keine Dephosphorylierung durch Calcineurin mehr stattfinden kann.^{49, 50} Daneben ist auch der *alternative splicing factor* (ASF) ein Substrat von DYRK1A. ASF ist verantwortlich für den Einbau des Exon 10 während des Spleißens von Tau und führt damit zur Bildung von 4R-Tau. Wird das Exon 10 nicht eingebaut, entsteht 3R-Tau. Ein ausgeglichenes Verhältnis von 3R- zu 4R-Tau ist wichtig für die korrekte Funktion der Neuronen. Die Phosphorylierung des ASF durch DYRK1A führt zu dessen Inaktivierung und damit zu einem erhöhten Anteil von 3R-Tau, was auch die Bildung der neurofibrillären Bündel begünstigt.^{4, 40, 50, 51}

An der Bildung der β -Amyloid-Plaques ist DYRK1A vermutlich über zwei Mechanismen beteiligt. Zum einen phosphoryliert die Kinase direkt das APP und begünstigt damit die Spaltung durch die β - und γ -Sekretase im Vergleich zur α -Sekretase, wodurch vermehrt A β gebildet wird.⁵² Außerdem ist auch Presenilin-1, eine Untereinheit der γ -Sekretase, ein Substrat von DYRK1A. Die Phosphorylierung von Presenilin-1 führt zu einer erhöhten Aktivität der γ -Sekretase und damit zu einer vermehrten A β -Produktion.⁵³ Gleichzeitig führt A β außerdem zu einem positiven *feedback*-Mechanismus und erhöht wiederum die DYRK1A-Transkription.⁵⁴

Neben der Verwicklung in die Pathomechanismen des DS und der Alzheimer-Erkrankung spielt DYRK1A möglicherweise auch in der Entstehung von Diabetes und Tumoren eine Rolle. Untersuchungen von DIRICE *et al.*⁵⁵ zeigten, dass die Inhibition von DYRK1A die Proliferation der insulinsekretierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas stimuliert. Es wird angenommen, dass dabei der Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), der durch die Phosphorylierung durch DYRK1A inaktiv im Zellplasma vorliegt, aktiviert wird, in den Zellkern wandert und zur Transkription von Proteinen für die Zellteilung führt.^{56, 57} Die Rolle von DYRK1A bei der Entstehung von Krebs ist nicht eindeutig und anscheinend gewebespezifisch, da sie sowohl an tumorhemmenden als auch tumorfördernden Prozessen beteiligt ist. Sie scheint aber auf jeden Fall beim Glioblastom und bei der akuten megakarioblastischen Leukämie eine onkogene Funktion einzunehmen.^{42, 58}

1.2.3 Inhibitoren

Da DYRK1A offenbar eine wichtige Rolle bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen spielt, stellt sie ein interessantes *target* für die Entwicklung neuer Arzneistoffe dar. In den letzten zehn Jahren wurden gezielt einige Inhibitoren entwickelt, die sowohl natürlichen als auch chemisch-synthetischen Ursprungs sind.⁴ Das Ziel bei der Entwicklung von neuen DYRK1A-Inhibitoren ist es, möglichst potente und selektive Substanzen zu identifizieren. Die

Selektivität ist nicht nur für den möglichen späteren Einsatz als Arzneistoff relevant, sondern vor allem auch, um gezielt die Funktion der Kinase in Zellkultur- und Tiermodellen zu untersuchen.²⁸ Die Entwicklung selektiver Inhibitoren stellt aber insbesondere bei Proteinkinasen eine große Herausforderung dar, da alle das Substrat ATP binden und die Bindetaschen daher eine sehr große strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. Speziell DYRK1B und CLK1 sind aufgrund ihrer hohen Strukturähnlichkeit häufige *off-targets* von DYRK1A-Inhibitoren.⁵⁹

Das natürlich vorkommende β -Carbolinalkaloid Harmin (**1**) (Abbildung 1-2) wurde 2007 von BAIN *et al.*⁶⁰ in einem Selektivitätsscreening als potenter DYRK1A-Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 0.08 μ M identifiziert. Dabei zeigte es auch etwa zehnfache Selektivität gegenüber den verwandten Kinasen DYRK2 und DYRK3. In weiteren *in vitro* Untersuchungen zeigte sich allerdings, dass keine bzw. nur geringe Selektivität gegenüber DYRK1B und CLK1 besteht.^{61, 62} Harmin weist eine gute Zellpermeabilität auf und eignet sich daher gut für Untersuchungen in Zellkulturen. Es konnte gezeigt werden, dass es die Phosphorylierung der DYRK1A-Substrate Tau-Protein⁶³, Caspase 9⁶⁴ und *splicing factor* 3B1 (SF3B1)⁶¹ in Zellen hemmt. Die Phosphorylierung von SF3B1 in HeLa-Zellen wird mit einem IC_{50} -Wert von 48 nM inhibiert und damit ist die Aktivität sogar vergleichbar zur *in vitro* Kinaseinhibition.⁶¹ Der Einsatz von Harmin in Tiermodellen wird allerdings durch seine potente Inhibition der Monoaminoxidase A (MAO-A) eingeschränkt (IC_{50} = 107 nM)^{65, 66}, weshalb in verschiedenen Ansätzen versucht wurde, die Struktur von Harmin so zu modifizieren, dass die DYRK1A-Aktivität erhalten, aber die MAO-A-Inhibition vermindert bzw. komplett aufgehoben wird. Durch Austausch der 1-Methylgruppe des Harmins gegen Chlor und zusätzliche Substitution am N^9 -Stickstoff wurde die Verbindung AnnH75 (**2**) (Abbildung 1-2) erhalten, die zwar eine etwas geringere DYRK1A-Inhibition (IC_{50} = 181 nM) dafür aber keine MAO-A-Inhibition mehr aufweist.⁶⁶ Auch in weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Substitution an N^9 und Variation der 1-Methylgruppe zur Aufhebung der MAO-A-Aktivität führt.^{67, 68}

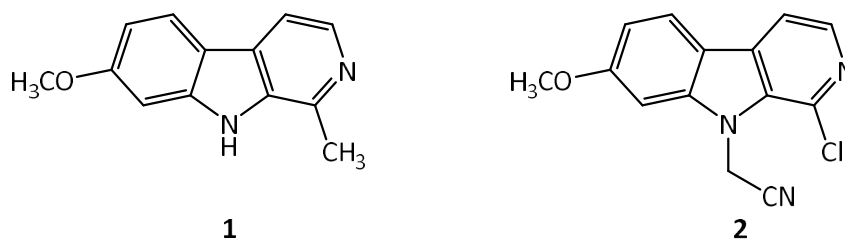


Abbildung 1-2: Strukturen des DYRK1A-Inhibitors Harmin (**1**) und des Derivates AnnH75 (**2**), das keine MAO-A-Inhibition mehr aufweist.

Auch der Naturstoff Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) (**3**) aus dem grünen Tee ist ein Inhibitor von DYRK1A (Abbildung 1-3). Von den hier beschriebenen Substanzen ist er der einzige nicht-kompetitive Inhibitor und weist *in vitro* einen IC_{50} -Wert von 0.33 μM auf.⁶⁹ EGCG wurde bereits intensiv in Mausmodellen mit DYRK1A-Überexpression und auch in Menschen mit DS getestet. Dabei hatte es sowohl positiven Einfluss auf die veränderte Hirnstruktur als auch auf kognitive Fähigkeiten.^{41, 70}

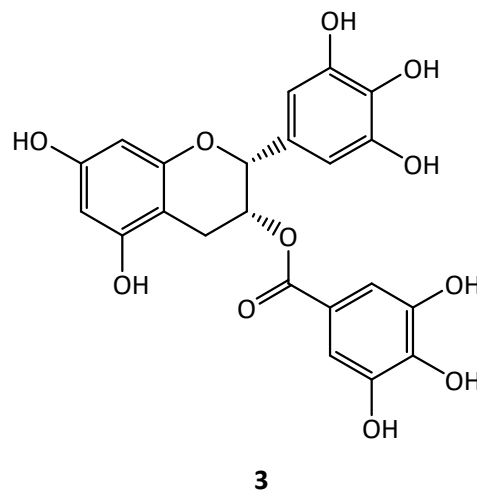


Abbildung 1-3: Struktur von Epigallocatechin-3-gallat (**3**).

Neben diesen Naturprodukten existieren auch noch Inhibitoren, die sich von der Struktur natürlicher Verbindungen ableiten. Die Chromeno[3,4-*b*]indol-Derivate beispielsweise wurden ausgehend von Lamellarin D (**4**) entwickelt, das in Meeresbewohnern wie Seescheiden oder Schwämmen vorkommt und ein unselektiver Kinaseinhibitor ist. Dabei zeigte Verbindung **5** (Abbildung 1-4) mit einem IC_{50} -Wert von 0.067 μM die höchste Aktivität.⁷¹

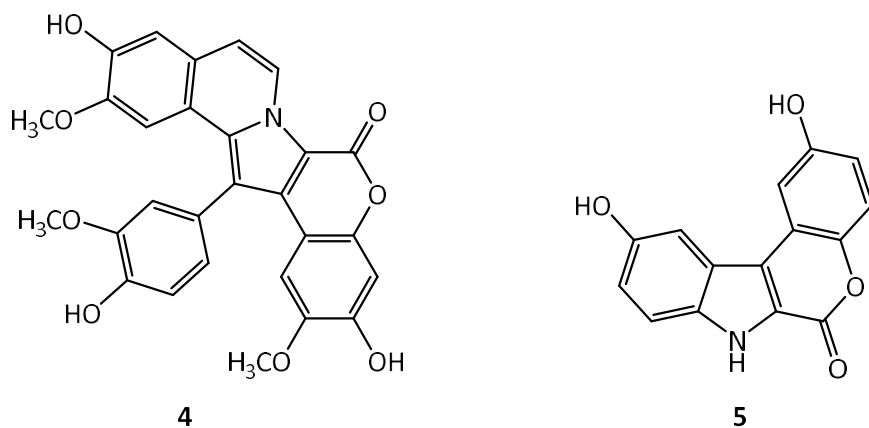


Abbildung 1-4: Strukturen von Lamellarin D (**4**) und des davon abgeleiteten Chromeno[3,4-*b*]indol-Derivats **5**.

Daneben wurden auch synthetische Derivate der Meridianine entwickelt, die ebenfalls marinen Ursprungs sind. Die Meridianin-Derivate weisen einen Indolgrundkörper mit einem substituierten 2-Aminopyrimidinring in Position 3 des Indols auf, der zwei Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region der Kinase formt. Die potenteste Verbindung der Meridianine stellt Struktur **6** mit einem IC_{50} -Wert von $0.034\ \mu M$ gegenüber DYRK1A dar. Allerdings wird auch die CLK1 mit gleicher Aktivität gehemmt.⁷² SHAW *et al.* entwickelten ausgehend von den Meridianinderivaten weitere DYRK1A-Inhibitoren. Der Austausch des Indols gegen ein 6-Azaindol ermöglicht eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zum Lys188 und führte mit Verbindung **7** zu einem sehr potenten Inhibitor ($IC_{50} = 0.001\ \mu M$) (Abbildung 1-5).⁷³

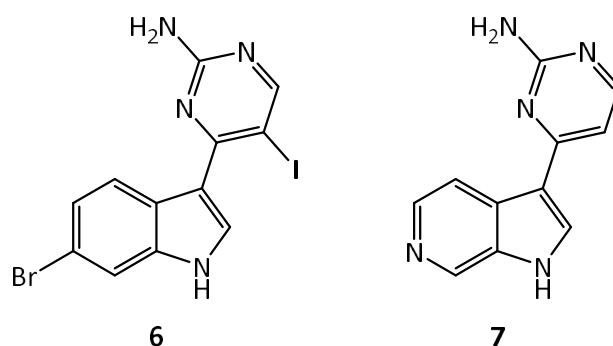


Abbildung 1-5: Struktur der Meridianin-Derivate **6** und **7**.

Der etablierteste DYRK1A-Inhibitor, der sich von einem Naturstoff ableitet, ist Leucettin L41 (**8**). Leucettin L41 ist ein synthetisches Derivat von Leucettamin B (**9**), das aus dem Schwamm *Leucetta microraphis* isoliert wurde und ein mikromolarer Inhibitor der Kinasen der DYRK- und CLK-Familien ist (Abbildung 1-6). Leucettin L41 ist ein potenter Inhibitor von DYRK1A ($IC_{50} = 0.041\ \mu M$), zeigt aber keine Selektivität gegenüber DYRK1B und CLK1 ($IC_{50} = 0.044$ bzw. $0.071\ \mu M$).^{62, 74} Es ist auch in zellulären Assays aktiv und wirkt sowohl *in vitro* als auch in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit mit A β -induzierter Neurotoxizität neuroprotektiv.^{62, 75}

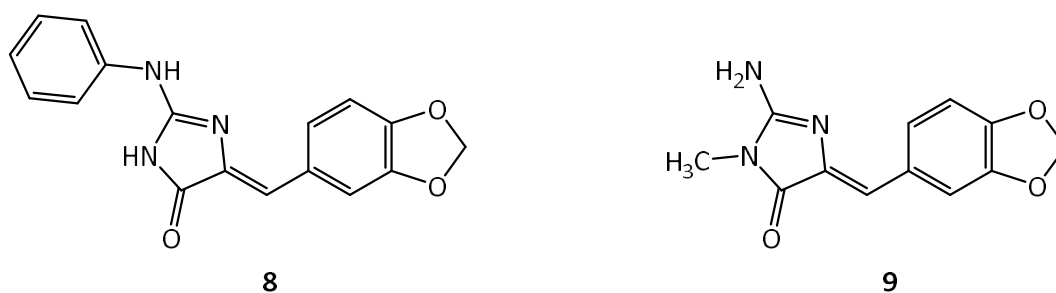


Abbildung 1-6: Struktur von Leucettamin B (**9**) und des daraus abgeleiteten DYRK1A-Inhibitors Leucettin L41 (**8**).

Neben den Naturstoffen bzw. von Naturstoffen abgeleiteten Inhibitoren gibt es auch eine Reihe synthetischer DYRK1A-Inhibitoren. 2010 wurde von OGAWA *et al.* das Benzothiazol-Derivat INDY (*inhibitor of dyrk*) (**10**) publiziert, das sich von dem bereits bekannten CLK1-Inhibitor TG003 (**11**) ableitete (Abbildung 1-7). INDY hemmt neben DYRK1A ($IC_{50} = 0.24 \mu M$) auch die verwandten Kinasen DYRK1B ($IC_{50} = 0.23 \mu M$) sowie DYRK2, DYRK3, CLK1 und CLK4. INDY zeigt zelluläre Aktivität und hemmt die DYRK1A-vermittelte Phosphorylierung des Tau-Proteins und die Blockierung des NFAT-Signalwegs. Außerdem zeigt das *Prodrug* ProINDY (**12**) (Abbildung 1-7) Aktivität in *in vivo* Versuchen und hemmt die durch DYRK1A-Überexpression verursachte Missbildung von Kopf und Augen in Kaulquappen des Krallenfrosches *Xenopus laevis*.⁷⁶

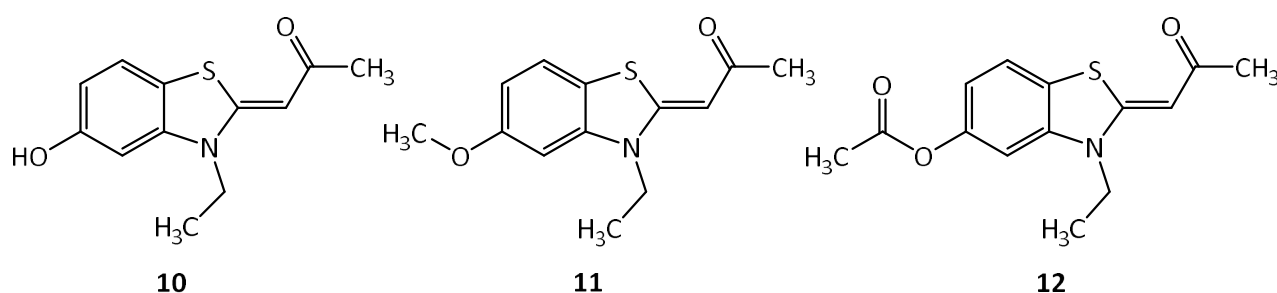


Abbildung 1-7: Strukturen des DYRK1A-Inhibitors INDY (**10**), des verwandten CLK1-Inhibitors TG003 (**11**) und des Prodrugs ProINDY (**12**).

Als Weiterentwicklung von INDY wurde BINDY (**13**) (Abbildung 1-8) entwickelt, bei dem durch die Vergrößerung des aromatischen Systems und Einbindung der freien Hydroxygruppe in einen Benzofuranrest die Aktivität sowohl an DYRK1A ($IC_{50} = 0.025 \mu M$) als auch an DYRK1B ($IC_{50} = 0.036 \mu M$) erhöht wurde.⁷⁷

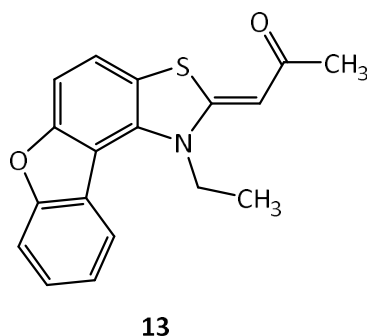


Abbildung 1-8: Struktur von BINDY (**13**).

Seit der Beschreibung der etablierten DYRK1A-Inhibitoren Harmin, Leucettin L41 und INDY wurde eine Reihe weiterer DYRK1A-Inhibitoren veröffentlicht, die deutlich größere Aktivität an DYRK1A zeigen. 2013 wurden von GOURDAIN *et al.* 3,5-Diaryl-7-azaindole als die bis dahin potentesten DYRK1A-Inhibitoren synthetisiert. Diese sogenannten DANDYs (*diaryl-azaindole inhibitors of DYRK1A*) besitzen auch die in den Strukturen **5-7** beobachtete Indolgrundstruktur mit einem aromatischen Rest in Position 3. Zusätzlich tragen sie einen weiteren Arylring in Position 5 des Indols. Beide Ringe wurden in verschiedenen Mustern mit Methoxy- und Hydroxygruppen substituiert. Dabei zeigten generell die Hydroxyverbindungen eine größere Aktivität, da durch die freie OH-Gruppe eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zum Protein ermöglicht wird. Die größte Aktivität an DYRK1A zeigte Verbindung **14** mit einem IC_{50} -Wert von 3 nM, allerdings wurden auch weitere Kinasen der CMGC-Gruppe gehemmt (Abbildung 1-9).⁷⁸ Ausgehend von den DANDYs wurden von ZHOU *et al.* weitere DYRK1A-Inhibitoren entwickelt und auf ihre zytotoxische Aktivität an Glioblastom-Zelllinien getestet, da DYRK1A in Glioblastomen überexprimiert ist und ihre Hemmung eine mögliche Therapieoption darstellt. Es zeigte sich, dass die 7-Azaindolgrundstruktur und der 4-Hydroxyphenylsubstituent in Position 3 essentiell für die inhibitorische Aktivität sind, am 5-Phenylring aber Modifikationen möglich waren. Der potenteste Inhibitor von DYRK1A ($IC_{50} = 6.6$ nM) dieser Untersuchungen ist Verbindung **15** (Abbildung 1-9) mit etwa fünffacher Selektivität gegenüber DYRK1B und CLK1 und zytotoxischer Wirkung an zwei Glioblastom-Tumorzelllinien, die aus Patienten gewonnen wurden ($EC_{50} = 0.9\text{--}2.1$ μM).⁷⁹

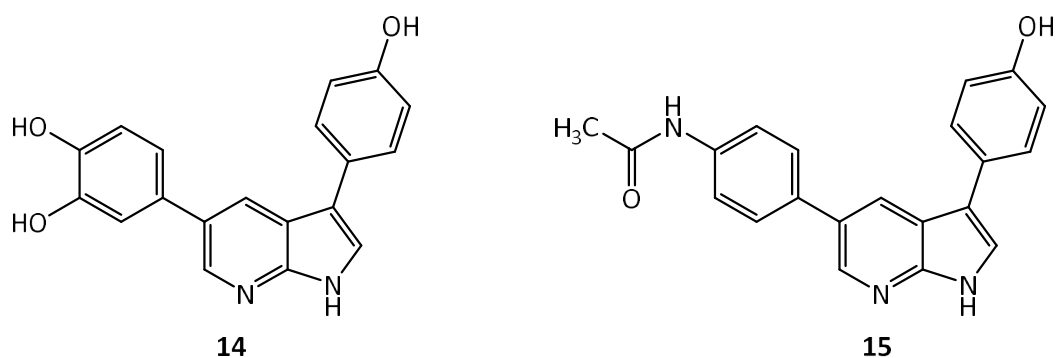


Abbildung 1-9: Struktur der 3,5-Diaryl-7-azaindole **14** und **15**, die potente Inhibitoren von DYRK1A sind.

Der Inhibitor CX-4945 (**16**) (Abbildung 1-10) von *casein kinase 2* (CK2) befindet sich bereits in klinischen Studien als mögliches Tumorthapeutikum. CX-4945 ist allerdings auch ein potenter Inhibitor von DYRK1A ($IC_{50} = 6.8$ nM), hemmt daneben aber auch die weiteren DYRKs ($IC_{50} = 6.4$ – 1500 nM) und CLKs ($IC_{50} = 3$ – 10 nM). CX-4945 zeigt auch in Zellkulturexperimenten und *in vivo* Untersuchungen eine sehr gute Aktivität. In HEK293T-Zellen hemmt es die Phosphorylierung der DYRK1A-Substrate Tau-Protein, APP und PS1 mit IC_{50} -Werten zwischen 80 – 200 nM. In transgenen Mäusen mit drei Kopien des DYRK1A-Gens und entsprechender 1.5-facher Überexpression von DYRK1A wurde die erhöhte Konzentration von an T212 phosphoryliertem Tau im Hippocampus durch orale Gabe von CX-4945 (75 mg/kg) auf etwa die normale Konzentration gesenkt.⁸⁰

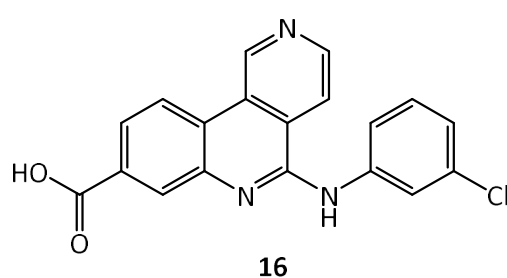


Abbildung 1-10: Struktur des DYRK1A-Inhibitors CX-4945 (**16**).

In einer Patentschrift wurden 2017 neue Benzimidazolderivate als ATP-kompetitive Inhibitoren von DYRK1A beschrieben.⁸¹ Die ausgewählte Verbindung Dyrk1-inh zeigt nanomolare Aktivität an DYRK1A ($IC_{50} = 34$ nM) und vergleichbare Aktivität an DYRK1B. Dyrk1-inh wurde über acht Wochen intraperitoneal an 3xTg-AD-Mäuse verabreicht, die ein Modell der Alzheimer-Demenz darstellen. Dadurch konnten die kognitiven Defizite verbessert und die Pro-

duktion von phosphoryliertem, unlöslichem Tau-Protein und A β vermindert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die DYRK1A-Inhibition eine mögliche neue Option in der Alzheimer-Therapie darstellt.⁸²

Die bisher potentesten DYRK1A-Inhibitoren stellen Methyl-9-anilinothiazolo[5,4-*f*]chinazolin-2-carbamidate dar, die subnanomolare Aktivität an DYRK1A und DYRK1B und gewisse Selektivität gegenüber CLK1 zeigen. Ein in *para*- und *ortho*-Position substituierter Phenylring an N⁹ führte zu den aktivsten Verbindungen, wobei das Dichlor-Derivat EHT 5372 (**17**) das vielversprechendste Derivat darstellt (Abbildung 1-11). EHT 5372 ist ein dualer Inhibitor von DYRK1A und DYRK1B (IC₅₀ = 0.22 bzw. 0.28 nM) und weist 38- bzw. 100-fache Selektivität gegenüber DYRK2 und CLK1 auf. **17** hemmt die Phosphorylierung des Tau-Proteins an Ser396 durch DYRK1A sowohl *in vitro* als auch in HEK293-Zellen. Daneben hemmt es auch die A β 40-Produktion in HEK293-Zellen, die APP überexprimieren. Die zelluläre Aktivität war allerdings in beiden Versuchen deutlich geringer (IC₅₀ = 1.1–1.7 μ M) als die *in vitro* Kinaseinhibition.^{83–85}

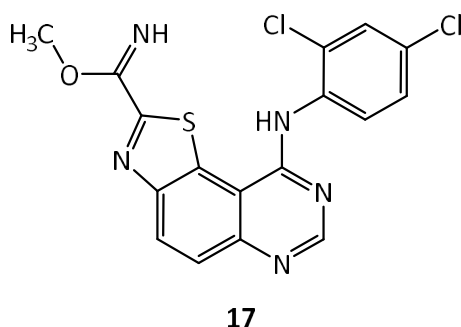


Abbildung 1-11: Struktur des bisher potentesten DYRK1A-Inhibitors EHT 5372 (**17**).

1.3 Verwandte Kinasen: DYRK1B und CLK1

Da alle Proteinkinasen das Substrat ATP im aktiven Zentrum des Enzyms binden, ist der Aufbau der Bindetasche aller Kinasen sehr ähnlich und erschwert damit die Entwicklung selektiver Inhibitoren. Insbesondere die verwandten Kinasen DYRK1B und CLK1 zeigen eine hohe Strukturähnlichkeit zu DYRK1A und stellen damit häufig unerwünschte *off-targets* von Inhibitoren dar. Vor allem DYRK1B zeigt eine hohe Homologie zu DYRK1A. Während die beiden Kinasen in der gesamten Kinasedomäne eine Sequenzübereinstimmung von 85 % aufweisen, unterscheidet sich die Sequenz in der ATP-Bindetasche in nur einer Aminosäure. Die *gk+2*-

Aminosäure Methionin (Met240) von DYRK1A ist in DYRK1B gegen Leucin ausgetauscht. Die Kinasedomänen von CLK1 und DYRK1A dagegen zeigen insgesamt nur eine Sequenzübereinstimmung von etwa 30 % und innerhalb des aktiven Zentrums gibt es etwas stärkere Abweichungen als bei DYRK1B. Auch in CLK1 ist die *gk*+2-Aminosäure Methionin gegen Leucin ausgetauscht. Außerdem ist aber Ser242 gegen Glycin, Ile165 gegen Leucin und Lys167 gegen Glutamat ausgetauscht (Abbildung 1-12). Bis auf die Position 165 sind die Seitenketten dieser Aminosäuren allerdings nicht in Richtung der Bindetasche orientiert, sodass sie kaum Auswirkung auf deren Oberflächenstruktur haben.

	165	166	167	168	170	173	186	188	203	222	238	239	240	241	242	294	306	307
DYRK1A	I	G	K	G	F	V	A	K	E	V	F	E	M	L	S	L	V	D
DYRK1B	I	G	K	G	F	V	A	K	E	V	F	E	L	L	S	L	V	D
CLK1	L	G	E	G	F	V	A	K	E	V	F	E	L	L	G	L	V	D

Abbildung 1-12: Sequenzvergleich der Aminosäuren von DYRK1A, DYRK1B und CLK1, die an der Ausbildung der ATP-Bindetasche beteiligt sind. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz von DYRK1A. Die Unterschiede sind in rot hervorgehoben.

In Abbildung 1-13 ist der Vergleich der Oberflächenstruktur der Bindetaschen dargestellt. Die Struktur des aktiven Zentrums von DYRK1A und DYRK1B ist sehr ähnlich und weist kaum Unterschiede auf. Die Bindetasche von DYRK1B scheint etwas kleiner zu sein. Beim Vergleich der Struktur von DYRK1A mit der von CLK1 fallen etwas stärkere Unterschiede auf. Insgesamt ist bei letzterer die Bindetasche etwas kleiner und in Richtung des Lösemittels stärker geschlossen. Auch der Eingang zur Bindetasche ist aufgrund des Austausches von Ile165 gegen Leucin etwas enger als bei DYRK1A.

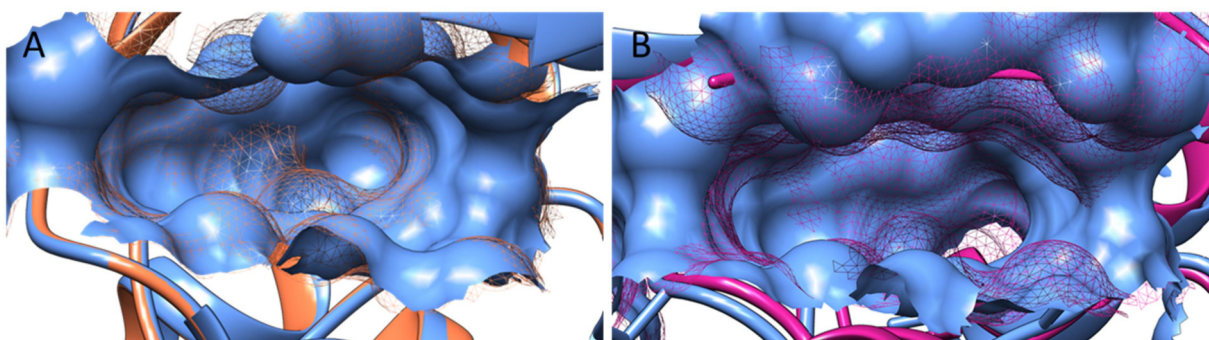


Abbildung 1-13: Vergleich der Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche von DYRK1A (blau, PDB:4YLJ) mit DYRK1B (A, braun, Homologiemodell, vgl. Kapitel 2.5) und CLK1 (B, pink, 2VAG⁸⁶)

1.4 Halogenbindungen

Etwa 26 % der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe enthalten mindestens ein Halogenatom. Daher spielen neben Wasserstoffbrückenbindungen auch Halogenbindungen eine wichtige Rolle in der Protein-Ligand-Interaktion.⁸⁷

Der Begriff „Halogenbindung“ wird seit 1978 verwendet und bezeichnet gerichtete Interaktionen zwischen kovalent gebundenen Halogenatomen und Elektronenpaardonatoren. Aufgrund ihrer freien Elektronenpaare agieren Halogene normalerweise als Lewis-Basen. Allerdings ist die Ladung in der Elektronenhülle der Halogene ungleich verteilt, was zur Bildung eines partiell positiv geladenen σ -hole führt. Dieses σ -hole agiert als Elektronenpaarakzeptor und kann somit mit Elektronenpaardonatoren wechselwirken. Da das σ -hole bei Fluor aufgrund der kleinen Atomhülle nicht auftritt, werden Halogenbindungen nur von Chlor, Brom und Iod gebildet. Dabei nimmt die Stärke der Bindung mit zunehmender Größe des Atoms von Chlor über Brom zu Iod zu, liegt aber insgesamt unterhalb der Bindungsstärke von Wasserstoffbrückenbindungen. Für die Ausbildung von Halogenbindungen ist die Anordnung der beteiligten Bindungspartner zueinander sehr wichtig. Die Bindungsstärke ist sowohl abhängig vom Abstand des Halogens und des Elektronenpaardonators als auch vom sogenannten σ -hole-Winkel, der den Winkel zwischen der kovalenten C-X-Bindung und der X--Y-Halogenbindung darstellt. Der Abstand sollte unterhalb der Summe der van-der-Waals-Radii der beteiligten Atome liegen. Für Interaktionen mit Sauerstoff liegt dieser Abstand für Cl--O bei 3.27 Å, für Br--O bei 3.37 Å und für I--O bei 3.50 Å. Allerdings darf der Abstand auch nicht unterhalb von 2.50 Å liegen, da es sonst zu einer Überlappung des Elektronenpaares des Nucleophils mit dem partiell negativ geladenen Bereichs der Elektronenhülle des Halogens und damit zu einer Abstoßung kommt. Der σ -hole-Winkel sollte bei 180° liegen. Die Intensität der Halogenbindung ist stark abhängig von diesem Winkel, da es bei Abweichungen vom Idealwert nicht zu einer Überlappung zwischen dem partiell positiv geladenen σ -hole und den Elektronen des Nucleophils kommt. Schon kleine Abweichungen führen daher zu einem starken Verlust der Bindungsenergie und unterhalb eines σ -hole-Winkel von 140° wird nicht mehr von einer Halogenbindung gesprochen.⁸⁸

Häufig wird eine Halogenbindung zwischen dem Liganden und einem Carbonylsauerstoff des Proteinrückgrats ausgebildet.⁸⁹ In Abbildung 1-14 ist beispielhaft eine Halogenbindung zwischen dem CLK3-Inhibitor KH-CB19 und dem *backbone* von Glu237 (*gk+1*) der *hinge*-Region dargestellt.⁸⁶

Neben Sauerstoff sind auch Stickstoff und π -Elektronen von aromatischen Systemen mögliche Interaktionspartner von Halogenen.⁸⁹ Außerdem ergab eine Recherche von Xu *et al.* in den Kristallstrukturen der PDB, dass nur 82.4 % der Halogenbindungen direkt zwischen dem Liganden und dem biologischen Wirtsmolekül ausgebildet werden. In 16.6 % der Fälle diente ein Wassermolekül, das über weitere Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rezeptor interagiert, als Elektronenpaardonator für die Wechselwirkung mit dem Halogenatom. Aufgrund einer zu geringen Auflösung sind in Kristallstrukturen häufig nicht alle Wassermoleküle erkennbar, sodass möglicherweise noch häufiger Halogenbindungen zu Wasser ausgebildet werden.⁸⁷ In einer Untersuchung von ZHOU *et al.* wurde gezeigt, dass diese wasservermittelten Halogenbindungen thermodynamisch stabil sind und für die Protein-Ligand-Interaktion eine wichtige Rolle spielen.⁹⁰

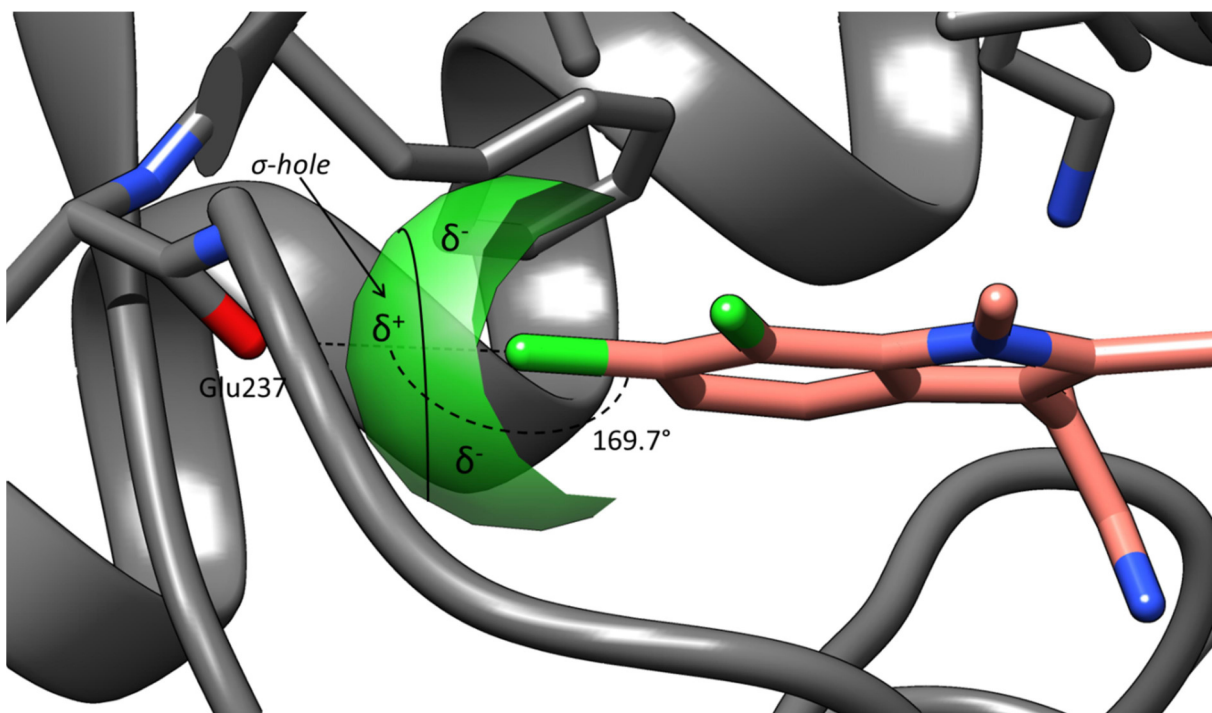


Abbildung 1-14: Schematische Darstellung der Halogenbindung zwischen einem Chloratom (grün) des Liganden KH-CB19 und dem Carbonylsauerstoffatom von Glu237 der *hinge*-Region der CLK3 (PDB: 2WU7⁸⁶). Durch die ungleiche Ladungsverteilung in der Elektronenhülle des Halogenatoms entsteht das partiell positiv geladene σ -hole, das mit Elektronenpaardonatoren interagieren kann. Häufig wird in Protein-Ligand-Komplexen eine Wechselwirkung mit einem *backbone*-Carbonylsauerstoff beobachtet, in diesem Fall mit Glu237. Der σ -hole-Winkel ist eingezeichnet und beträgt 169.7° und liegt damit nah am idealen Wert von 180°. Auch der Cl–O-Abstand erfüllt mit 3.06 Å die Anforderungen an Halogenbindungen.

1.5 Physikochemische Eigenschaften von Wirkstoffkandidaten

Bereits seit den 1980er Jahren zeigen neu entwickelte Arzneistoffe den Trend zu einer immer höheren relativen Molmasse und höheren logP-Werten, also zu höherer Lipophilie. Gleichzeitig führen diese Eigenschaften auch zu einem häufigeren Scheitern in den präklinischen und klinischen Studien, da sie großen Einfluss auf die sogenannten ADME-Eigenschaften (Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion) haben.^{91, 92} Daher werden inzwischen bereits im Entwicklungsprozess neben der biologischen Aktivität auch die physikochemischen Eigenschaften der Inhibitoren betrachtet. Die „*rule of five*“ von LIPINSKI *et al.* war eins der ersten Konzepte zur frühen Bewertung der sogenannten *druglikeness* von Wirkstoffkandidaten. Die *rule of five* beschreibt, dass eine schlechte Absorption und Permeation nach oraler Verabreichung von Wirkstoffen wahrscheinlicher sind, wenn die relative Molmasse größer als 500, der logP größer als fünf, die Anzahl an Wasserstoffbrückendonatoren größer als fünf und die Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren größer als zehn ist.⁹³ Mit der *ligand efficiency* (LE) und der *ligand-lipophilicity efficiency* (LLE) wurden zwei weitere Konzepte zur Beurteilung der *druglikeness* entwickelt.⁹⁴ Ebenso wird die Bestimmung und Vorhersage der Wasserlöslichkeit von neu entwickelten Inhibitoren bereits früh in den Entwicklungsprozess integriert.⁹⁵

1.5.1 LE und LLE

Im Gegensatz zu den *rule of five* von LIPINSKI *et al.* werden mit dem LE- und LLE-Wert nicht nur isoliert die physikochemischen Eigenschaften von potenziellen Arzneistoffen bewertet, sondern diese im Verhältnis zur biologischen Aktivität betrachtet.

Der LE-Wert setzt die Affinität des Inhibitors zum Rezeptor in Relation zu seiner Molekülmasse und berechnet sich ursprünglich aus der freien Gibbs-Bindungsenergie dividiert durch die Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome (HA) des Inhibitors ($LE = \frac{\Delta G}{HA}$). Da die freie Bindungsenergie aber nur selten bestimmt wird, kann der LE unter Standardbedingungen näherungsweise aus $LE = \frac{1.37 \text{ kcal/mol}}{HA} * pIC_{50}$ berechnet werden. Häufig wird auch der *ligand efficiency index* (LEI) als LE-Wert bezeichnet, der vereinfacht aus dem pIC_{50} dividiert durch die Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome berechnet wird und einen dimensionslosen Wert ergibt ($LEI = \frac{pIC_{50}}{HA}$). Der Zielwert für Arzneistoffkandidaten ist ein LE-Wert größer als 0.3 kcal/mol/HA.

Der LLE-Wert bewertet die biologische Aktivität der Liganden im Verhältnis zu ihrer Lipophilie und berechnet sich, indem vom pIC_{50} der $\log P$ -Wert als Maß der Lipophilie subtrahiert wird ($LLE = pIC_{50} - \log P$). Während der Entwicklung wird also angestrebt, die Aktivität des Inhibitors zu verbessern, ohne gleichzeitig auch die Lipophilie zu erhöhen. Dabei sollte der LLE-Wert von Arzneistoffen möglichst Werte zwischen fünf und sieben annehmen.^{94, 96}

1.5.2 Löslichkeit

Die Löslichkeit einer Verbindung ist definiert als die maximale Konzentration der Substanz in einem bestimmten Lösemittel im Gleichgewichtszustand mit der festen Form. Da die Auflösung der Substanz Voraussetzung für die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt ist, hat die Wasserlöslichkeit Einfluss auf die ADME-Eigenschaften. Aber auch in weiteren präklinischen Tests spielt sie eine wichtige Rolle. Wird die Substanz nicht vollständig gelöst, verfälscht dies die Ergebnisse von biologischen *in vitro* und *in vivo* Assays.⁹⁷ Daher sollte die Bestimmung oder Vorhersage der Löslichkeit in wässrigen Medien bereits in die Entwicklung neuer Wirkstoffe integriert werden. Die Löslichkeit ist kein eindeutiger, substanzspezifischer Wert, da sie von vielen Faktoren abhängt. So haben z.B. das Lösemittel, der pH-Wert und die Temperatur Einfluss auf den ermittelten Wert. Außerdem wird zwischen der kinetischen und thermodynamischen Löslichkeit unterschieden. Die thermodynamische Löslichkeit ist die Löslichkeit der thermodynamisch stabilsten Kristallmodifikation der Substanz nach Einstellung eines Gleichgewichts zwischen gelöster und fester Form. Dazu wird ein Überschuss an fester Substanz mit einer definierten Menge an Lösemittel über 24 bis 72 Stunden inkubiert. Die kinetische Löslichkeit dagegen wird ausgehend von der gelösten Form und nicht im Gleichgewicht mit dem Feststoff bestimmt. Eine Stammlösung der Verbindung in einem organischen Lösemittel, häufig in Dimethylsulfoxid (DMSO), wird mit dem wässrigen Lösemittel versetzt und die Konzentration ermittelt, bei der die Verbindung präzipitiert. Damit beschreibt die kinetische Löslichkeit die Löslichkeit der am schnellsten präzipitierenden Modifikation.^{97, 98} Auch aufgrund des Zusatzes von DMSO ist die kinetische Löslichkeit häufig größer als die thermodynamische Löslichkeit.

Neben der experimentellen Bestimmung kann der $\log S$ -Wert und damit die Löslichkeit mit diversen Programmen kalkuliert werden. Eine einfache Methode zur theoretischen Abschätzung der Löslichkeit stellt die Yalkowsky-Gleichung dar ($\log S = 0.5 - 0.01 * (MP - 25) - \log P$).⁹⁹ Darin wird der $\log S$ -Wert aus dem $\log P$ -Wert, dem Maß für die Lipophilie, und dem Schmelzpunkt (MP, in °C) der Verbindung berechnet. Der Schmelzpunkt dient dabei als Pa-

rameter zur Abschätzung der Kristallgitterenergie, die überwunden werden muss, um die Teilchen in Lösung zu bringen. Somit kann die Löslichkeit bereits vor der Synthese oder weiteren Entwicklung von Arzneistoffen bewertet werden. Potenzielle Wirkstoffe sollten eine Löslichkeit größer als 60 µg/mL oder 200 µmol/L aufweisen.^{95, 100}

1.6 Aufgabenstellung

DYRK1A scheint eine wichtige Rolle für die kognitiven Einschränkungen beim Down Syndrom, die neurotoxischen Ablagerungen bei Alzheimer-Patienten und möglicherweise auch bei Diabetes und einigen Krebsformen zu spielen und stellt damit eine attraktive Zielstruktur für neue Arzneistoffe dar. Vor allem zur weiteren Untersuchung der Funktion von DYRK1A wurden, wie oben beschrieben, bereits einige Inhibitoren entwickelt. Diese Verbindungen zeigen aber alle den Nachteil, dass sie entweder keine selektiven Inhibitoren von DYRK1A sind und auch die strukturell ähnliche DYRK1B oder CLK1 hemmen oder ihre Aktivität in zellulären Assays deutlich herabgesetzt ist. Die nicht vorhandene Selektivität verhindert, dass die in Zellexperimenten oder Tiermodellen beobachteten Effekte eindeutig der DYRK1A-Hemmung zugeordnet werden können. Daher wurden von FALKE 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren als neue DYRK1A-Inhibitoren mit dem Ziel einer verbesserten Selektivität entwickelt (Abbildung 1-15). Dabei stellte sich heraus, dass ein Iodsubstituent in Position 10 sowohl zu den aktivsten als auch selektivsten Verbindungen führte. Die potenteste Verbindung KuFal194 (**18a**) zeigte einstellig nanomolare Aktivität ($IC_{50} = 6$ nM) an DYRK1A und über 80-fache Selektivität gegenüber DYRK1B und CLK1 ($IC_{50} = 600$ bzw. 500 nM). Verbindung **18b** mit einem zusätzlichen 3-Methoxysubstituenten zeigte zwar etwas geringere Aktivität an DYRK1A ($IC_{50} = 22$ nM), dafür aber über 90-fache Selektivität gegenüber den einzigen *off-targets* CLK1 und CLK4. Auffällig war dabei auch, dass die Aktivität der 10-halogenierten Verbindungen von Chlor (**18c**) über Brom (**18d**) zu Iod (**18a**) anstieg, was vermuten lässt, dass möglicherweise Halogenbindungen eine Rolle für die Protein-Ligand-Interaktion spielen.

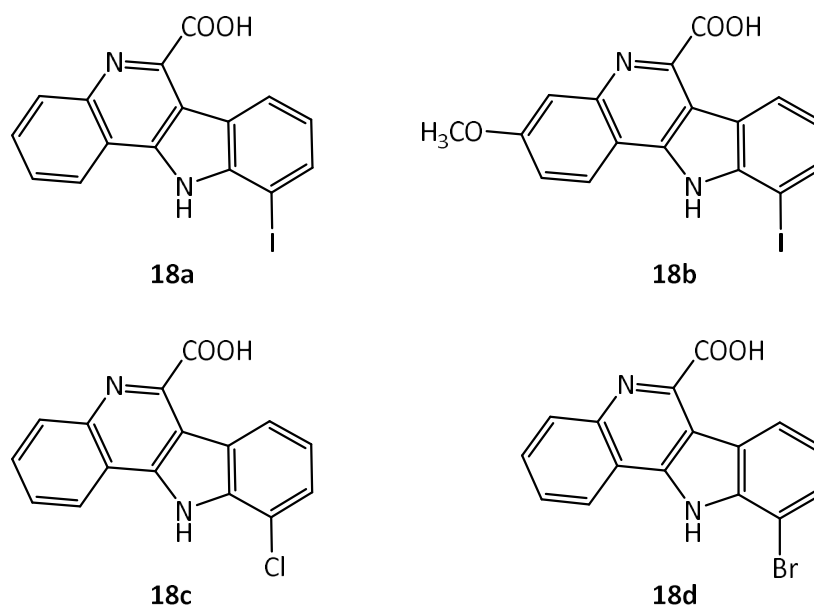


Abbildung 1-15: Struktur der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **18a-d**.

Ähnlich wie bei EHT 5372 (**17**) war die Aktivität von KuFal194 (**18a**) in zellulären Assays deutlich schlechter im Vergleich zur *in vitro* Aktivität in den Enzymassays. Die Phosphorylierung von SF3B1 in HeLa-Zellen und die Phosphorylierung des Tau-Proteins in HEK293-Zellen wurden mit einem IC₅₀-Wert von 0.5 bzw. 2.1 µM inhibiert. Die verminderte zelluläre Aktivität beruht möglicherweise auf einer schlechten Zellpermeabilität sowie auf der schlechten Wasserlöslichkeit aufgrund des flachen, aromatischen Grundgerüsts.^{101, 102} Angesichts der schlechten Löslichkeit der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren wurden bereits von FALKE unter Beibehaltung des 7-Halogenindolmotivs Strukturen mit verringerter relativer Molmasse entwickelt. Dabei entstand Verbindung **19a** (Abbildung 1-16), die ein mikromolarer Inhibitor von DYRK1A (IC₅₀ = 1.1 µM) ist und vergleichbare Aktivität an CLK1 zeigte.¹⁰³

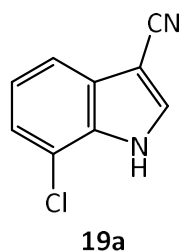


Abbildung 1-16: Struktur des Fragments **19a**, das als Ausgangsverbindung für die Entwicklung neuer Strukturen in dieser Arbeit diente.

Ausgehend von der Struktur **19a** sollten in dieser Arbeit in einem fragmentbasierten Design 1*H*-Indol-3-carbonitrile als neue DYRK1A-Inhibitoren mit möglichst hoher Aktivität und Selektivität entwickelt werden. Bereits beim Entwurf der neuen Verbindungen sollten gleichzeitig auch die physikochemischen Eigenschaften, insbesondere die Wasserlöslichkeit, mit einbezogen werden. Zunächst sollte der Halogensubstituent an Position 7 des Indols variiert werden, um den bereits bei den Verbindungen von FALKE beobachteten Effekt des Halogens auf die Aktivität und Selektivität zu untersuchen. Anschließend sollten auf der Basis von *docking*-Untersuchungen weitere Strukturmodifikationen vorgenommen werden. Anhand des vorhergesagten Bindemodus von **19a** in der ATP-Bindetasche von DYRK1A wurden Position 1 und 2 des Indols für weitere Modifikationen identifiziert. An diesen Positionen sollten neue Substituenten eingeführt werden, die sowohl in Hinblick auf ihren Einfluss auf die Aktivität als auch auf die physikochemischen Eigenschaften ausgewählt wurden. Die physikochemischen Eigenschaften der geplanten Verbindungen wurden bereits vor der Synthese anhand der berechneten logP- und logS-Werte beurteilt. Die kinaseinhibitorische Aktivität aller synthetisierten Verbindungen sollte bei Kooperationspartnern (ManRos Therapeutics, Roscoff, Frankreich) bestimmt werden. Von ausgewählten Verbindungen sollten sowohl die thermodynamische als auch die kinetische Löslichkeit bestimmt und mit den vorhergesagten Werten verglichen werden.

2 Rationales Wirkstoffdesign

Beim rationalen Design von Arzneistoffkandidaten sollen optimierte neue Liganden mithilfe computergestützter Methoden entwickelt werden. Dafür muss der Aufbau der Bindetasche der Zielstruktur, des sogenannten *targets*, bekannt sein. Die Kristallstrukturen vieler Protein-Ligand-Komplexe sind inzwischen in der *protein data bank* (PDB) im Internet frei verfügbar. Von DYRK1A existieren zurzeit 18 experimentell ermittelte Kristallstrukturen, die mittels Röntgendiffraktometrie erzeugt wurden. Mithilfe von *docking*-Experimenten werden neue Liganden entworfen, in die Bindetasche eingepasst und anhand der Ergebnisse weiter optimiert. Unter *docking* versteht man das Einsetzen des Liganden in die Bindetasche des *targets* und die Vorhersage eines möglichen Bindemodus, um mögliche Interaktionen zwischen Ligand und Protein zu bewerten. Anhand des potentiellen Bindemodus können systematisch Modifikationen am Liganden vorgenommen und weitere Substituenten eingeführt werden, um zusätzliche Wechselwirkungen mit dem *target* zu ermöglichen. Beim *docking* werden immer mehrere mögliche Orientierungen des Liganden in der Bindetasche erzeugt, die durch *scoring*-Funktionen, auch *fitness functions* genannt, bewertet werden. Beim *scoring* wird die Bindungsaffinität des Liganden zum Protein in den jeweiligen erhaltenen Posen abgeschätzt, indem näherungsweise die Bindungsenergie berechnet wird.^{104, 105}

Die *docking*-Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) durchgeführt.¹⁰⁶ Dieses Programm ist dadurch charakterisiert, dass sowohl der Ligand als auch der Rezeptor als flexibel betrachtet werden. Dabei ist die Beweglichkeit des Rezeptors allerdings eingeschränkt. Die Seitenketten von Serin, Threonin, Tyrosin und Lysin können während des *docking runs* rotiert werden, sodass die polaren Hydroxylgruppen und die Aminogruppe zum Liganden ausgerichtet werden, um Wasserstoffbrücken zu ermöglichen. Die Flexibilität kann aber manuell auch auf die Seitenketten weiterer Aminosäuren innerhalb der definierten Bindestelle ausgeweitet werden. Auf der anderen Seite kann die Flexibilität aber auch aufgehoben werden, sodass der Rezeptor während des *dockings* als komplett starr betrachtet wird.¹⁰⁷ GOLD verwendet einen genetischen Algorithmus (GA), um sowohl verschiedene Konformationen des Liganden als auch verschiedene Bindemodi des Liganden in der Bindetasche zu erzeugen und vorteilhafte Bindepasen zu identifizieren. Der GA leitet sich von der Evolutionstheorie nach Darwin ab und wendet das gleiche Prinzip an. Zunächst wird eine Pose des Liganden gebildet, die als Chromosom

bezeichnet und durch Gene charakterisiert wird. Die Qualität dieser Pose wird mit einer *scoring*-Funktion bewertet. Anschließend wird durch Mutation der Gene, *crossing-over* der Chromosomen und Migration eine Population neuer Chromosomen erzeugt und wieder mittels *scoring* bewertet. Dabei werden die besten Chromosomen selektiert und wiederum durch Mutation, *crossing-over* und Migration verändert und anschließend bewertet. Dieser Prozess wird mehrmals wiederholt, sodass sukzessiv eine Optimierung der Chromosomen bzw. Ligandenposen auftritt. Anschließend werden die erhaltenen Posen nochmals mittels *scoring* bewertet und ein Ranking aufgestellt.¹⁰⁴ Die *scoring*-Funktion dient damit sowohl bereits während des *docking*-Prozesses zur Bewertung und Optimierung der intermediär erzeugten Posen als auch zur abschließenden Beurteilung und Klassifizierung der erhaltenen Bindemodi des Liganden in der Bindetasche. Die in dieser Arbeit verwendete *chemscore*-Funktion ist eine empirische *scoring*-Funktion. Dabei wird zur Abschätzung der Bindungsaffinität eine Gleichung aufgestellt, in die verschiedene Beiträge zur Bindungsenergie, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Interaktionen mit Metallionen, einfließen. Außerdem werden auch Entropieänderungen und der Einfluss einer möglichen Kollision von Ligand und Rezeptor mit einbezogen. Die jeweiligen Terme werden durch Faktoren gewichtet, die anhand eines Trainingssets erhalten wurden, das aus 82 Protein-Ligand-Kristallstrukturen bestand, für die experimentelle Bindungsaffinitäten vorlagen. Darüber hinaus ist es möglich, in die *chemscore*-Funktion spezielle Parameter für das *docking* in Kinasen zu implementieren. Dabei werden zusätzlich zu den oben genannten Termen auch schwache Wasserstoffbrücken zwischen aktivierten CH-Gruppen in stickstoffhaltigen Heteroaromaten und Sauerstoff für die Berechnung der Bindungsaffinität miteinbezogen.^{107–109}

2.1 Bindemodi ausgewählter DYRK1A-Inhibitoren

Von DYRK1A existieren inzwischen 18 Protein-Ligand-Kristallstrukturen. Darunter befinden sich auch Strukturen von Komplexen des Proteins mit den etablierten Inhibitoren Harmin (**1**), INDY (**10**) und Leucettin L41 (**8**). Die Kristallstrukturen geben Aufschluss über die Struktur der Bindetasche und über häufige Interaktionsmotive der Inhibitoren.

Harmin

Die Kristallstruktur von Harmin (**1**) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (PDB: 3ANR) wurde 2010 zusammen mit der Kristallstruktur des INDY-DYRK1A-Komplexes von OGAWA et al. ver-

öffentlich.⁷⁶ Das aromatische Grundgerüst liegt flach in der Bindetasche und zeigt zahlreiche hydrophobe Interaktionen mit den Seitenketten der Aminosäuren Val173, Ala186, Phe238, Leu241, Leu294 und Val306. Diese Aminosäuren führen dazu, dass die ATP-Bindestelle insgesamt sehr hydrophob ist. Die Methoxygruppe und der Pyridinstickstoff sind für die polaren Interaktionen mit dem Protein verantwortlich. Die Methoxygruppe bildet eine Wasserstoffbrücke zum *backbone*-NH von Leu241 (*gk*+3) der *hinge*-Region aus und der Pyridinstickstoff bildet eine zweite Wasserstoffbrücke zur Seitenkette des konservierten Lys188 (Abbildung 2-1).

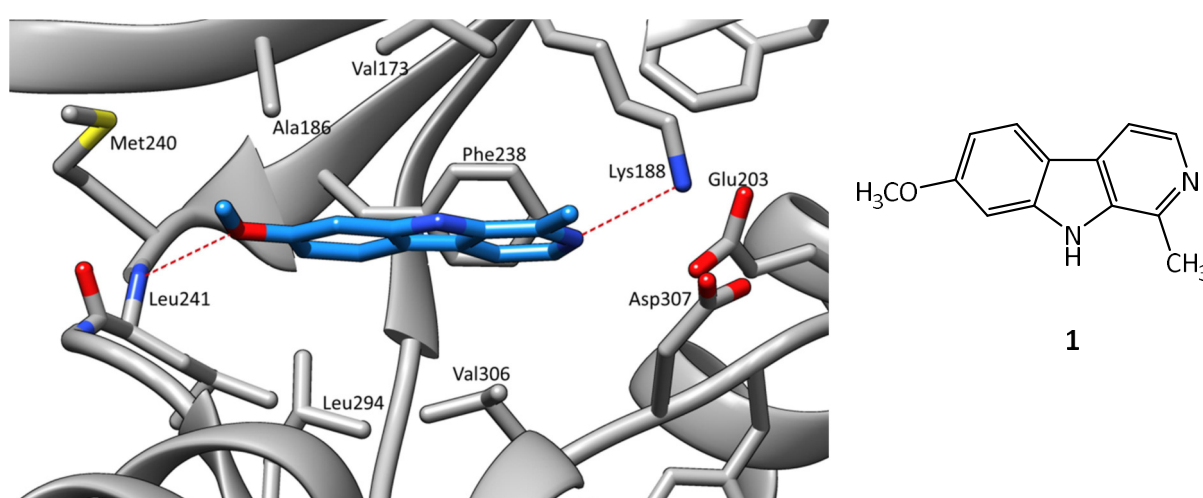


Abbildung 2-1: Kristallstruktur von Harmin (**1**, blau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (grau) (PDB: 3ANR). Harmin liegt flach in der Bindetasche und bildet zwei Wasserstoffbrücken zum *target* aus. Die Methoxygruppe interagiert mit Leu241 der *hinge*-Region und der Pyridinstickstoff mit dem konservierten Lys188. Daneben kommt es zu zahlreichen hydrophoben Interaktionen mit den unpolaren Aminosäuren der Bindetasche. Wasserstoffbrücken sind als rote unterbrochene Linien dargestellt.

INDY

Auch die Kristallstruktur von INDY (**10**) in der ATP-Bindetasche (PDB: 3ANQ) von DYRK1A wurde 2010 von OGAWA *et al.* veröffentlicht.⁷⁶ Der Bindemodus von INDY ist sehr ähnlich zu dem von Harmin. Das planare aromatische Grundgerüst wird umschlossen von den unpolaren Aminosäuren des aktiven Zentrums und bildet zu diesen zahlreiche hydrophobe Interaktionen aus. Die Hydroxygruppe bildet eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoffatom des *backbone* von Leu241 der *hinge*-Region aus. Die Carbonylfunktion des Inhibitors interagiert mit der Ammoniumgruppe des konservierten Lys188 (Abbildung 2-2).

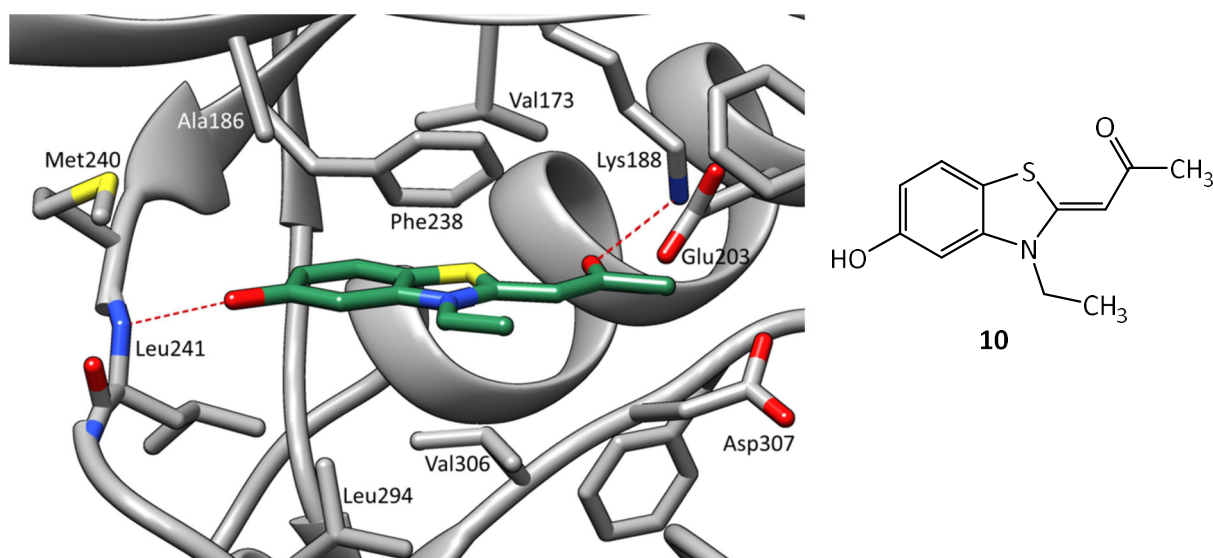


Abbildung 2-2: Kristallstruktur von INDY (**10**, grün) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (grau) (PDB: 3ANQ). Der aromatische Grundkörper zeigt hydrophobe Wechselwirkungen zu den ihn umgebenden unpolaren Aminosäuren. Wasserstoffbrückenbindungen zum Rezeptor werden durch die Hydroxygruppe zum *backbone*-Stickstoffatom des Leu241 und durch die Carbonylgruppe zur Seitenkette des Lys188 ermöglicht. Zur besseren Übersicht sind die Aminosäuren 164 bis 169 nicht dargestellt.

Leucettin L41

Die Co-Kristallstruktur von Leucettin L41 (**8**) mit DYRK1A zeigt, dass auch diese Verbindung ein ähnliches Interaktionsmotiv in der Bindetasche aufweist (PDB: 4AZE). Auch Leucettin L41 zeigt zwei polare Wechselwirkungen zum *backbone* des *gk+3* Leu241 und zum konservierten Lys188. Die Wasserstoffbrücke zur Amidstruktur von Leu241 wird durch ein Sauerstoffatom der Acetalpartialstruktur ermöglicht und die Carbonylstruktur interagiert mit der Aminfunktion von Lys188. Vermutlich bilden sich noch weitere wasservermittelte Wechselwirkungen zum Rezeptor aus, wie sie in der höher aufgelösten Kristallstruktur von DYRK2 zu sehen sind. Neben den polaren Interaktionen zeigt auch Leucettin L41 zahlreiche hydrophobe Interaktionen mit den unpolaren Aminosäuren am Boden der Bindetasche (Abbildung 2-3).⁶²

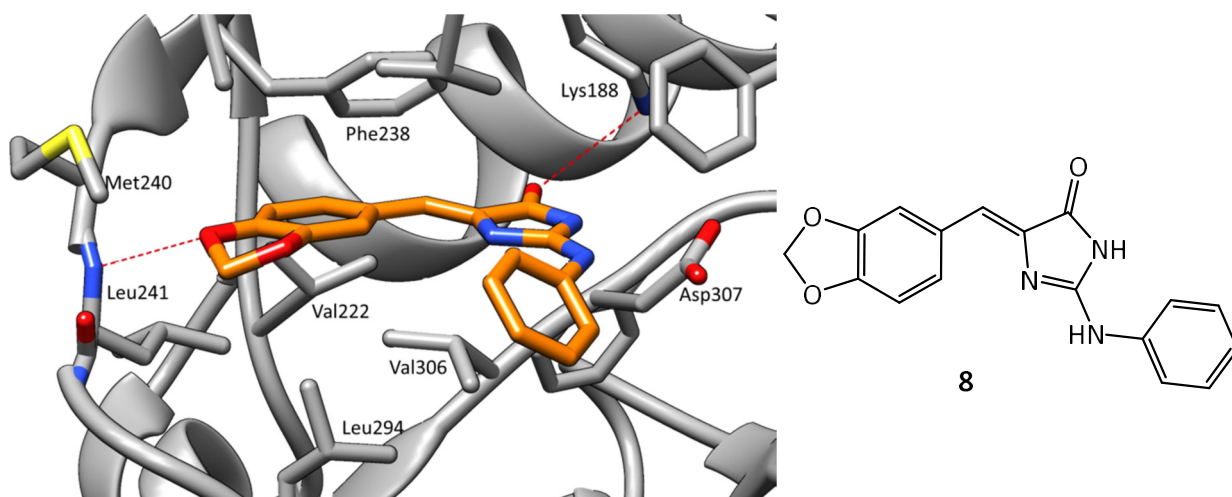


Abbildung 2-3: Co-Kristallstruktur von Leucettin L41 (**8**, orange) mit DYRK1A (grau) (PDB: 4AZE). Es bilden sich zwei Wasserstoffbrücken zum Leu241 der *hinge*-Region und zum konservierten Lys188 aus. Außerdem zeigen die aromatischen Ringe hydrophobe Wechselwirkungen mit den unpolaren Aminosäuren der Bindetasche. Zur besseren Übersicht sind die Aminosäuren 165 bis 168 nicht dargestellt.

EHT 5372

Der zur Zeit potenteste DYRK1A-Inhibitor EHT 5372 (**17**) konnte bisher nicht mit DYRK1A co-kristallisiert werden, allerdings existiert eine Kristallstruktur in DYRK2 (PDB: 5LXC), die Aufschluss über den möglichen Bindemodus gibt. Auffällig dabei ist, dass **17** nur mit dem konservierten Lys178 interagiert und keine direkte Wechselwirkung mit der *hinge*-Region existiert. Trotzdem ist **17** ein potenter DYRK2-Inhibitor ($IC_{50} = 10.8$ nM). Der Thiazolochinazolin-Grundkörper liegt tief in der ATP-Bindetasche und ist umgeben von unpolaren Aminosäuren, zu denen hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden. Außerdem interagiert dieses Grundgerüst durch aromatische Wechselwirkungen mit dem *gatekeeper* Phe228. Die Wasserstoffbrücke zum Lys178 wird vom N1 des Chinazolinrings geformt. Die Methylcarbamidstruktur ist zur *hinge*-Region orientiert, aber für eine direkte Wechselwirkung zu weit entfernt. Der disubstituierte Phenylring am N9 ragt aus der Bindetasche heraus und zeigt keine spezifischen Interaktionen, obwohl er wichtig zu sein scheint für Aktivität und Selektivität (Abbildung 2-4).

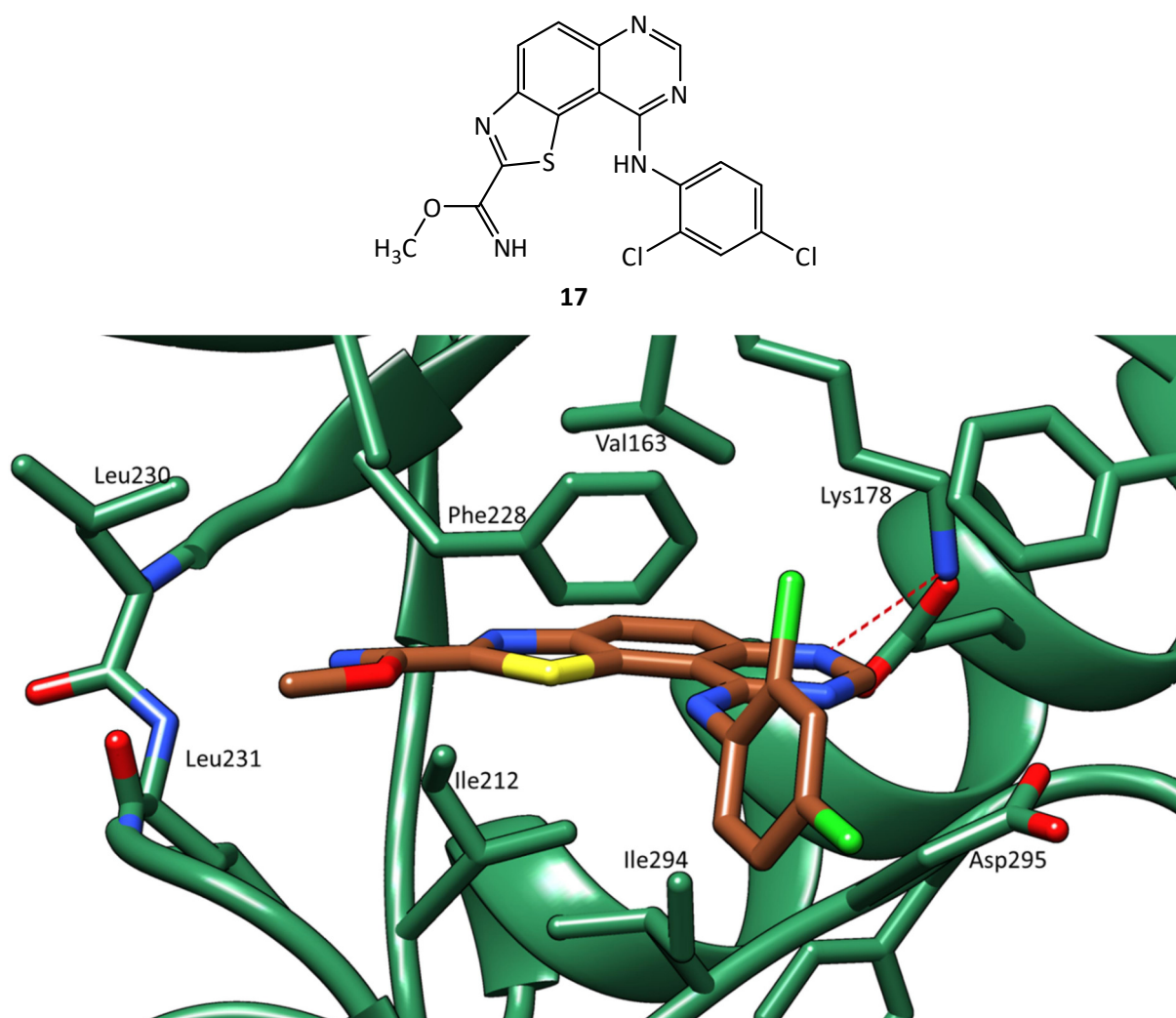


Abbildung 2-4: Bindemodus der Verbindung **17** (braun) in der ATP-Bindetasche von DYRK2 (grün) (PDB: 5LXC). Die Verbindung zeigt keine polaren Wechselwirkungen mit der *hinge*-Region und weist nur eine Wasserstoffbrückenbindung zum Rezeptor auf, die zwischen dem N1 des Chinazolinrings und der Seitenkette des konservierten Lys178 ausgebildet wird. Zur besseren Übersicht sind die Aminosäuren 155 bis 159 nicht dargestellt.

Bei *docking*-Studien mit DYRK1A konnte von CHAIKUAD *et al.* für **17** eine vergleichbare Pose erzeugt werden. Dabei liegt die Methylcarbamidatstruktur allerdings näher an der *hinge*-Region, sodass eine Wasserstoffbrücke vom Carbamidatstickstoff zum *backbone* von Leu241 gebildet werden kann. Dies erklärt möglicherweise die beobachteten Aktivitätsunterschiede.⁸³

2.2 Redocking

Von den 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren, die von FALKE synthetisiert wurden, konnten drei Verbindungen mit DYRK1A co-kristallisiert werden.¹⁰² Diese Kristallstrukturen

sollten für die *docking*-Studien dieser Arbeit verwendet werden, da sich die 1*H*-Indol-3-carbonitrile strukturell von den 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren ableiten und ein ähnlicher Bindemodus vermutet wurde. Um eine geeignete Kristallstruktur auszuwählen, wurden *redocking*-Untersuchungen durchgeführt. Beim *redocking* wird der Ligand, der mit dem Protein co-kristallisiert wurde, aus der Röntgenkristallstruktur entfernt und erneut in die Bindetasche dieser Kristallstruktur gedockt. Anschließend werden die beim *docking* erzeugten Posen mit der experimentell ermittelten Lage des Liganden in der Bindetasche verglichen. Zur Beurteilung der ermittelten Posen wird der sogenannte RMSD-Wert (*root mean square deviation*) berechnet. Dieser Wert gibt den mittleren Abstand zwischen der vorhergesagten und realen Lage des Liganden an und sollte entsprechend möglichst klein sein. Durch das *redocking* wird nachgewiesen, dass das verwendete *docking*-Programm den korrekten Bindemodus zuverlässig vorhersagen kann. Dazu sollte der ermittelte RMSD-Wert kleiner als 2.0 Å sein und die Pose des Liganden, die dem wirklichen Bindemodus entspricht, gleichzeitig auch durch die *scoring*-Funktion mit dem höchsten *score* bewertet werden.¹⁰⁹

DYRK1A wurde mit dem 10-iodsubstituierten Derivat **18a** (PDB: 4YLJ) und mit den 10-Chlor- und 10-Bromderivaten **18e** (PDB: 4YLK) bzw. **18f** (PDB: 4YLL) co-kristallisiert. Bei allen drei Kristallstrukturen wurden die Liganden zunächst aus der Bindetasche entfernt und anschließend mit GOLD verschiedene *docking*-Posen generiert. In der hinteren Bindetasche aller drei Strukturen befindet sich ein Wassermolekül, das zwei oder drei Wasserstoffbrücken zum Rezeptor ausbildet und auch mit dem Liganden interagiert. Da dieses Wasser wichtig für die Protein-Ligand-Interaktionen zu sein scheint, wurde es in die *docking*-Untersuchungen integriert. Dazu wurde die *toggle*-Funktion von GOLD verwendet. Dabei entscheidet das Programm während des *docking*-Vorgangs, ob das Wasser für die jeweilige Pose in der Bindetasche behalten oder gelöscht wird.¹⁰⁷ Die Ergebnisse des *redockings* sind in Abbildung 2-5 dargestellt. Für alle drei Kristallstrukturen wurde von GOLD der korrekte Bindemodus der Liganden generiert. Dabei wurde die jeweilige Pose, die der Originalposition entspricht, mit dem höchsten *score* bewertet. Der RMSD-Wert war bei allen Versuchen sehr gut und lag maximal bei 1.0 Å. Für die Struktur 4YLJ konnte die Originalpose am besten vorhergesagt werden, da der RMSD-Wert mit einem Wert von 0.69 Å am kleinsten war. Da dies gleichzeitig auch die Co-Kristallstruktur mit der potentesten Verbindung war, wurde diese für die weiteren *docking*-Untersuchungen ausgewählt. Dazu wurden zunächst noch einmal genau die Bindetasche und die Interaktionen der Verbindung **18a** mit dem Rezeptor analysiert.

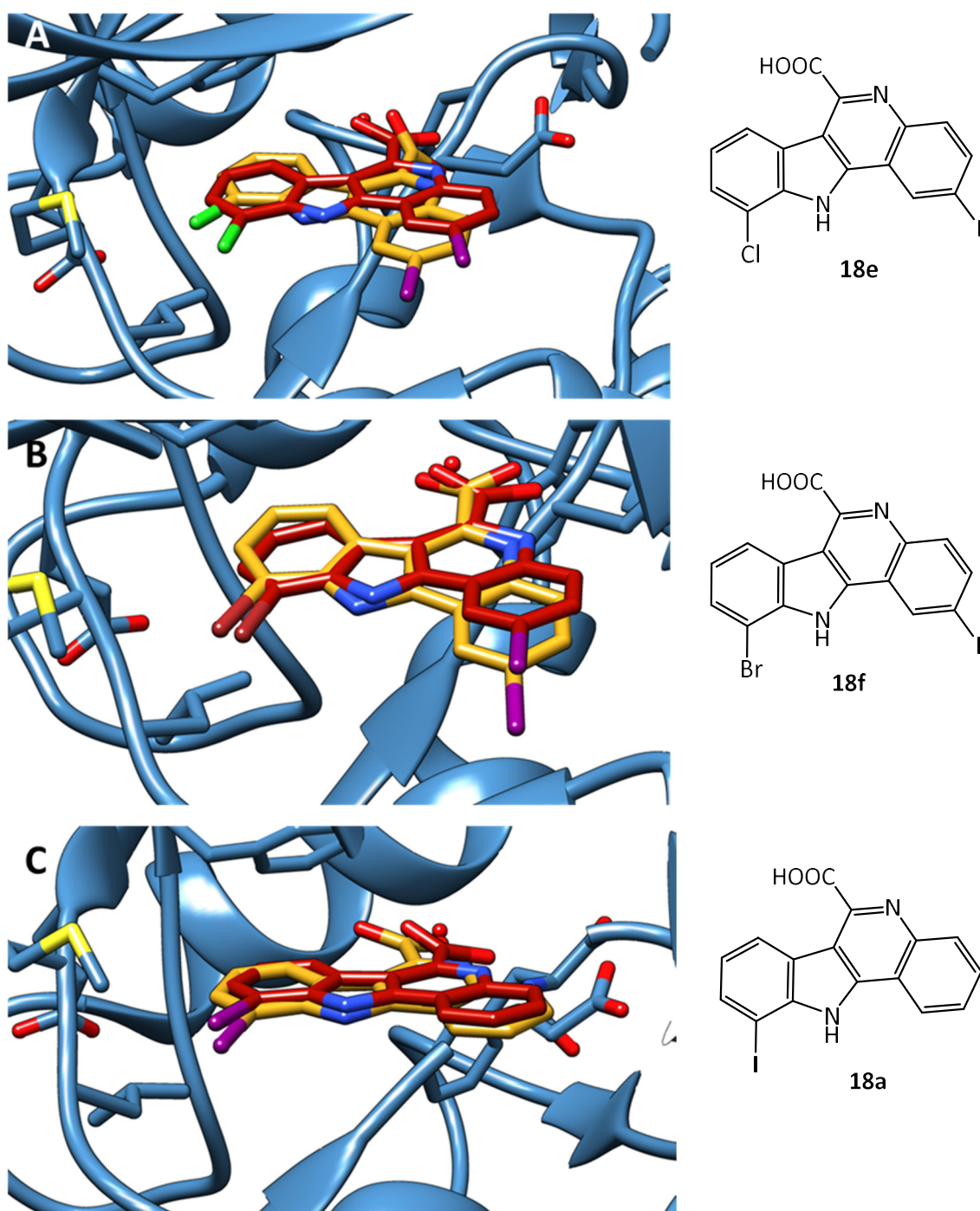


Abbildung 2-5: Ergebnisse des *redockings* der 11H-Indolo[3,2-c]chinolin-6-carbonsäuren. DYRK1A ist jeweils in blau, der Originalligand in rot und der von GOLD erzeugte Bindemodus in gelb dargestellt. Zur besseren Darstellung wurden jeweils die Aminosäuren 164 bis 167 entfernt. A: *Redocking* der 10-Chlorverbindung **18e** (PDB: 4YLK). Der ermittelte RMSD-Wert beträgt 1.0010 Å. B: *Redocking* der 10-Bromverbindung **18f** (PDB: 4YLL). Der ermittelte RMSD-Wert beträgt 0.9916 Å. C: *Redocking* der 10-Iodverbindung **18a** (PDB: 4YLJ). Für die Untersuchungen wurde nur die Kette a verwendet. Der ermittelte RMSD-Wert beträgt 0.629 Å und war damit der beste dieser drei Kristallstrukturen.

2.3 Bindemodus von KuFal194

Die potenteste Verbindung der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren ist die 10-Iodverbindung KuFal194 (**18a**). Die Carboxylgruppe liegt tief in der ATP-Bindetasche und bildet eine Salzbrücke zum konservierten Lys188 aus. In der hinteren Bindetasche befindet sich außerdem ein Wassermolekül, das mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zum Rezeptor ausbildet. Es interagiert sowohl mit dem konservierten Glu203 als auch mit dem Amidstickstoff des *backbone* von Asp307 und Phe308 des DFG-Motivs. Zusätzlich zu der direkten Interaktion mit dem Protein bildet die Carboxylgruppe eine Wasserstoffbrücke zu diesem Wassermolekül aus. Auch der Indolstickstoff interagiert mit einem Wassermolekül, das in ein Wasserstoffbrückennetzwerk eingebunden ist. Der aromatische Grundkörper von **18a** liegt flach in der Bindetasche und ist umgeben von den unpolaren Seitenketten der Aminosäuren Val173, Val222, Leu294 und Val306, zu denen hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden. Außerdem kommt es zu π - π -Interaktionen mit dem *gatekeeper* Phe238 und der Seitenkette von Phe170, die in Richtung des Liganden orientiert ist (Abbildung 2-6). Auffällig ist, dass KuFal194, im Gegensatz zu den Bindemodi der anderen DYRK1A-Inhibitoren, keine polare Wechselwirkung mit den Aminosäuren der *hinge*-Region aufweist, aber trotzdem eine hohe inhibitorische Aktivität zeigt. Da die Indolpartialstruktur mit dem Halogensubstituenten in Richtung *hinge*-Region orientiert ist, wurde zunächst vermutet, dass eine Halogenbindung zwischen dem Halogensubstituenten in Position 10 und dem *backbone*-Carbonylsauerstoffatom von Leu241 (*gk*+3) der *hinge*-Region gebildet wird.¹⁰²

Da die Aktivität der 10-halogenierten 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren von Chlor über Brom zu Iod ansteigt, ist dies ein weiterer Hinweis, dass Halogenbindungen in die Protein-Ligand-Interaktion involviert sein könnten. Eine Analyse der Bindungsgeometrie zwischen dem Carbonylsauerstoff von Leu241 und dem aromatischen Halogensubstituenten zeigte allerdings, dass eine Halogenbindung zwischen diesen Bindungspartnern sehr unwahrscheinlich ist. Während die Abstände in etwa den Idealwerten entsprechen, liegt der σ -*hole*-Winkel in allen drei Protein-Ligand-Komplexen zwischen 132.4° und 136.3°. Deshalb scheint es in diesem Fall unwahrscheinlich, dass eine direkte Interaktion über das Halogenatom zum *backbone* der *hinge*-Region auftritt (Abbildung 2-7).

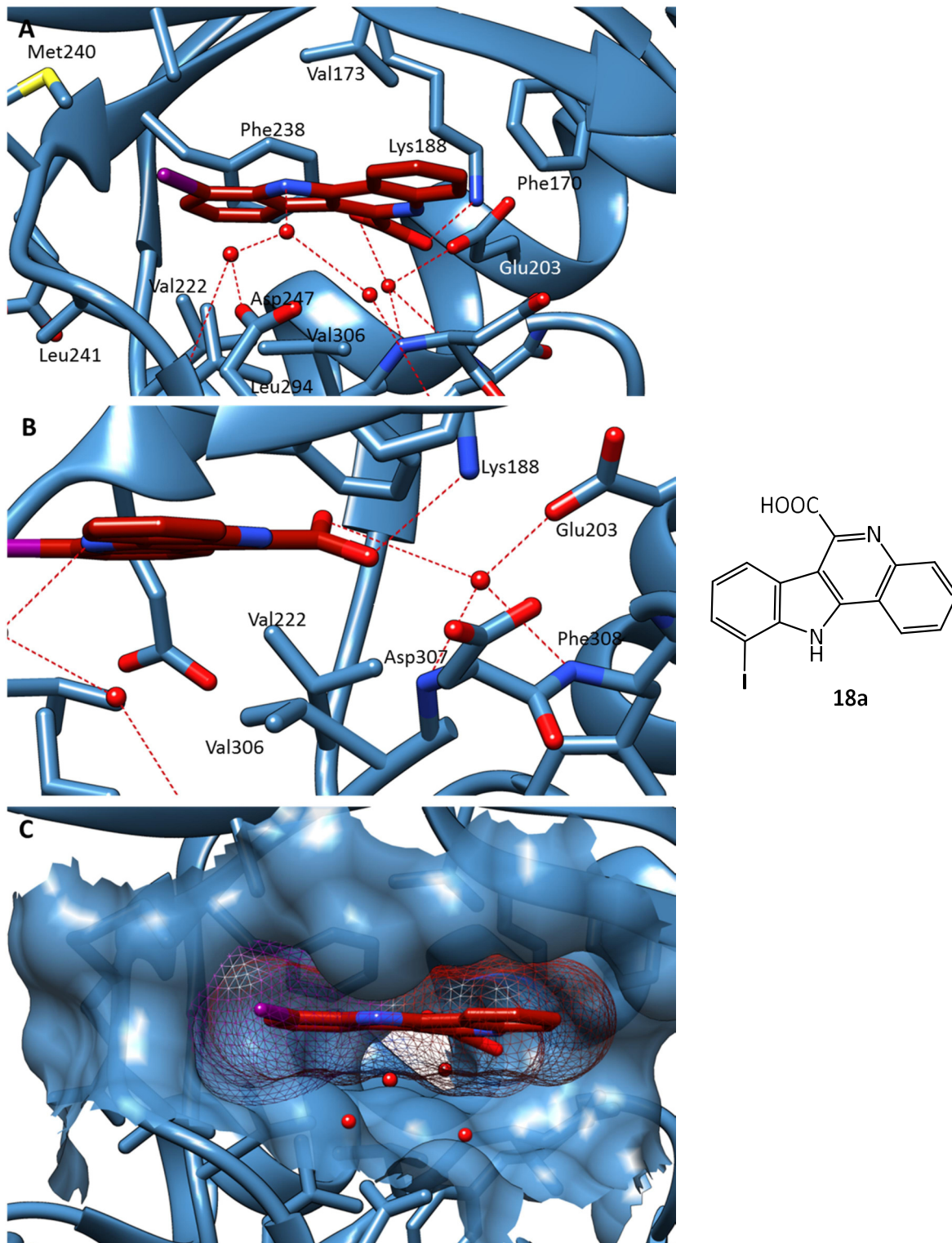


Abbildung 2-6: Analyse des Bindemodus von KuFal194 (**18a**, rot) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (blau) (PDB: 4YLJ). A: Die Carboxylgruppe bildet eine Salzbrücke zum konservierten Lys188 und eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül in der hinteren Tasche, das weitere Wasserstoffbrücken zur Kinase formt. Auch der Indolstickstoff interagiert mit einem Wassermolekül. Daneben bildet **18a** zusätzlich hydrophobe und π - π -Interaktionen mit dem Protein. B: Vergrößerter Anblick der Interaktionen der Carboxylgruppe im hinteren Teil der Bindetasche. C: Oberflächendarstellung der Bindetasche und des Volumens des Inhibitors. **18a** füllt die Bindetasche komplett aus und die Carboxylgruppe ragt tief nach hinten in die Tasche.

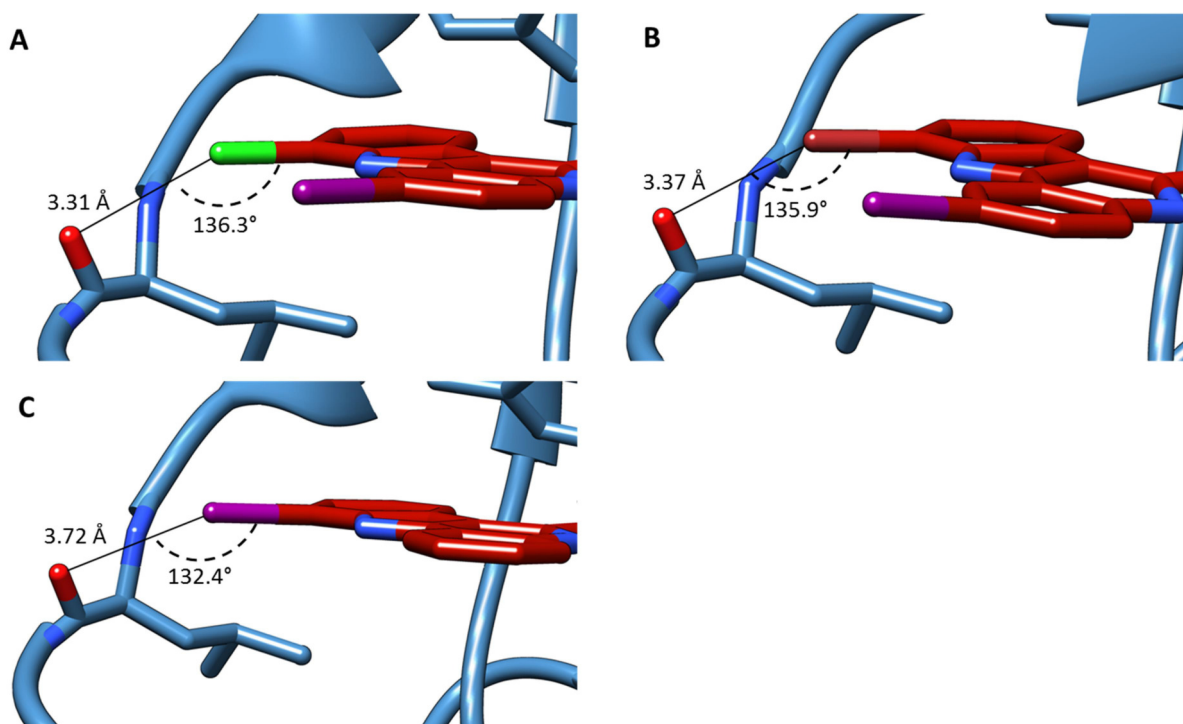


Abbildung 2-7: Analyse der Bindungsgeometrie einer möglichen Halogenbindung zwischen dem Halogensubstituenten in Position 10 der Verbindungen **18e**, **18f** und **18a** und dem Carbonylsauerstoff von Leu241 der *hinge*-Region. Der σ -hole-Winkel zwischen der Bindung C-X und der Halogenbindung X--O liegt in allen Kristallstrukturen unterhalb des Grenzwertes von 140° . A: Der Chlorsubstituent der Verbindung **18e** hat einen Abstand von 3.31 Å zum Carbonylsauerstoff. Dieser Abstand weicht nur gering vom idealen Abstand von 3.27 Å ab (PDB: 4YLK). B: Der Abstand von 3.37 Å zwischen dem Bromsubstituenten von **18f** und Leu241 entspricht exakt der Summe der van-der-Waals-Radii von Brom und Sauerstoff (PDB: 4YLL). C: Der Abstand zwischen Iod und Sauerstoff weicht etwas stärker nach oben vom Idealwert von 3.50 Å ab. Dies würde zu einer weiteren Schwächung der Bindungsenergie führen. Daher erscheint eine Halogenbindung hier sehr unwahrscheinlich.

Bei näherer Betrachtung der ATP-Bindetasche der Kristallstruktur 4YLJ fiel allerdings auf, dass sich im vorderen Teil der Bindetasche ein Wassermolekül befindet, das eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoffatom von Leu241 bildet. Auch der 10-Iodsubstituent von KuFal194 ist in Richtung dieses Wassermoleküls orientiert, sodass die Geometrie einer möglichen Halogenbindung zwischen Iod und Wasser analysiert wurde. Der Abstand beträgt 3.00 Å und ist somit kleiner als der Maximalabstand von 3.50 Å und in diesem Fall ist auch der σ -hole-Winkel von 168.5° deutlich näher am Idealwert von 180° (Abbildung 2-8). Somit scheint hier die wasservermittelte Halogeninteraktion eine bedeutende Rolle für die Affinität zum Rezeptor zu spielen und sollte daher auch für die *docking*-Untersuchungen in Betracht gezogen werden.

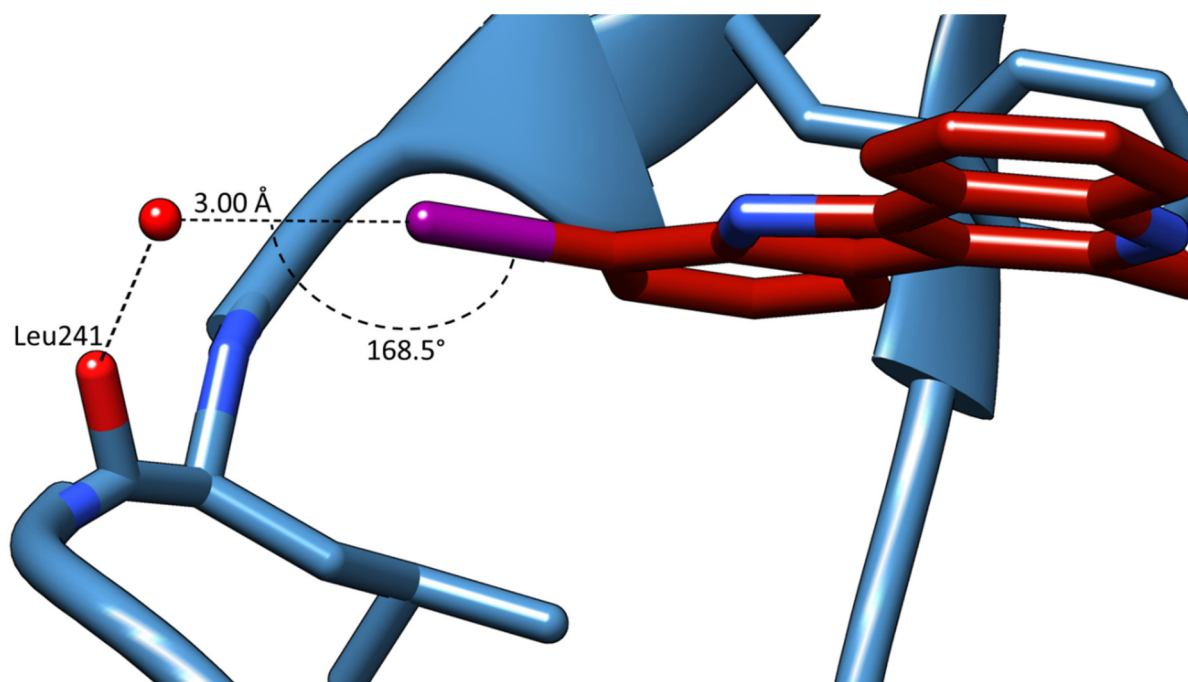


Abbildung 2-8: Wasservermittelte Halogenbindung zwischen dem 10-Iodsubstituenten von KuFal194 und DYRK1A. Der Iodsubstituent formt eine Halogenbindung zum Wassermolekül, das eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoffatom von Leu241 der *hinge*-Region bildet. Die geometrischen Eigenschaften dieser Interaktion erfüllen mit einem Abstand von 3.00 Å und einem σ -hole-Winkel von 168.5° nahezu ideal die Anforderung für Halogenbindungen.

2.4 Bindemodus der Indol-3-carbonitrile in DYRK1A

Die Synthese neuer Verbindungen sollte von *docking*-Studien geleitet werden. Dazu wurde zunächst das Fragment **19a**, das als Ausgangsverbindung dieser Arbeit diente, in die Bindetasche von DYRK1A (PDB: 4YLJ) gedockt und der Bindemodus untersucht. Da das Wassermolekül in der hinteren Bindetasche wichtig für die Interaktionen von KuFal194 ist, wurde es in die Untersuchungen integriert. Weil sich die Struktur von **19a** von den 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren ableitet, wurde eine ähnliche Orientierung in der Bindetasche angenommen. Dieser Bindemodus wurde beim *docking* von GOLD erzeugt und wurde mit dem höchsten *score* bewertet (Abbildung 2-9). Analog zur Carbonsäurefunktion von KuFal194 liegt die Nitrilgruppe in einer hinteren Tasche und interagiert direkt mit dem Amin des konservierten Lys188 und zusätzlich über das Wassermolekül mit den Aminosäuren Glu203, Asp307 und Phe308. Der Indolkörper ist so ausgerichtet, dass der 7-Chlorsubstituent in Richtung der *hinge*-Region zeigt. Das Fragment füllt den hinteren und linken Bereich der Bindetasche gut aus. Allerdings ist im vorderen und im rechten Bereich des aktiven Zentrums

noch Platz für weitere Substituenten. Daher sollte im nächsten Schritt der Halogensubstituent variiert und an Position 1 und 2 sollten neue Substituenten eingeführt werden, um den zusätzlichen Raum in der Bindetasche auszufüllen. Da die Substituenten an Position 2 in Richtung des Lösemittels zeigen, bot sich diese Position besonders zur Einführung polarer, löslichkeitsverbessernder Gruppen an. Die Nitrilgruppe wurde beibehalten, da sie für die polaren Interaktionen mit dem Protein verantwortlich zu sein scheint.

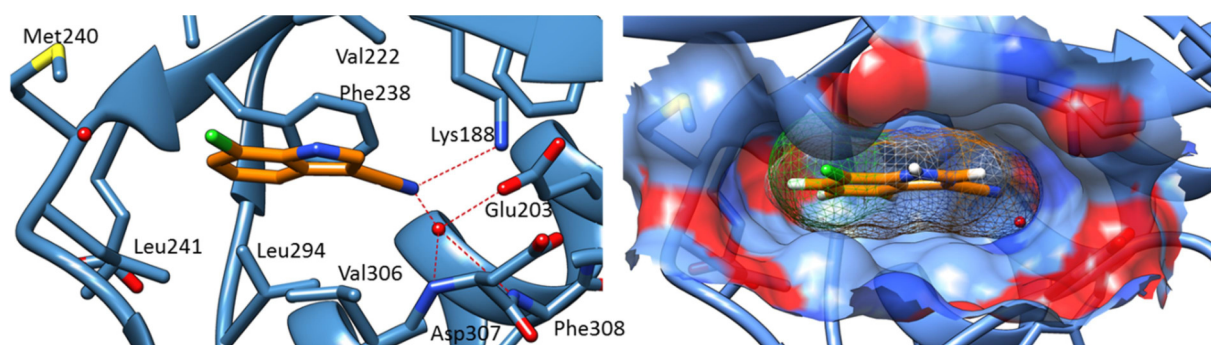
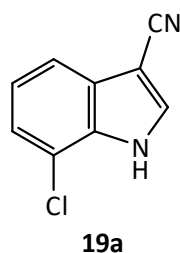


Abbildung 2-9: Möglicher Bindemodus des Fragments **19a** (orange) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (blau, PDB: 4YLJ). Die Nitrilgruppe liegt tief in der Bindetasche und formt eine Wasserstoffbrücke zum konservierten Lys188 und eine zweite zum Wassermolekül, das mit Glu203 und dem *backbone*-NH von Asp307 und Phe308 des DFG-Motivs interagiert. Die rechte Darstellung zeigt die Oberfläche der Bindetasche und des Liganden. Dabei ist die von Sauerstoff gebildete Oberfläche rot, die von Stickstoff dunkelblau und die von Kohlen- und Wasserstoff gebildete Oberfläche hellblau dargestellt. Das Fragment liegt tief in der Bindetasche und füllt die linke Seite sehr gut aus. Im vorderen und rechten Bereich der Bindestelle ist Platz für weitere Substituenten.

Variation des Halogensubstituenten in Position 7

Zunächst wurde der Chlorsubstituent an Position 7 des Indols gegen Brom (**19b**) und Iod (**19c**) ausgetauscht und die Verbindungen in DYRK1A gedockt. Auch von diesen Verbindungen konnte der vermutete Bindemodus von GOLD erzeugt werden, sodass alle Verbindungen die gleiche Interaktion mit dem Rezeptor wie das Chlorderivat **19a** zeigten (Abbildung 2-10).

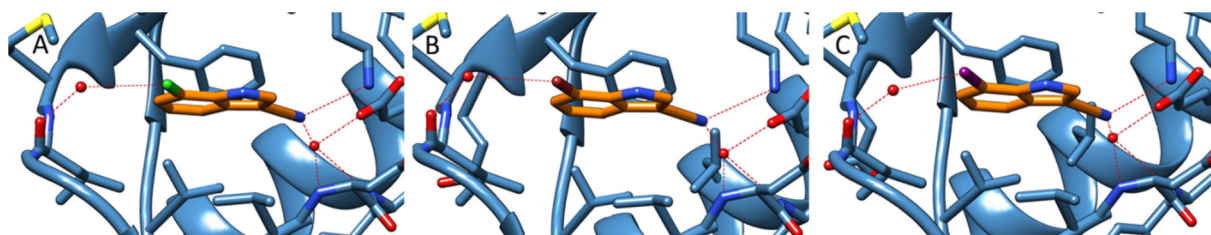


Abbildung 2-10: Dockingergebnisse der 7-halogenierten Verbindungen **19a–c** im Vergleich. A: $d(\text{Cl} \cdots \text{H}_2\text{O}) = 4.45 \text{ \AA}$, $\sigma\text{-hole}$ -Winkel $\alpha(\text{C-Cl} \cdots \text{H}_2\text{O}) = 148.02^\circ$. B: $d(\text{Br} \cdots \text{H}_2\text{O}) = 4.27 \text{ \AA}$, $\sigma\text{-hole}$ -Winkel $\alpha(\text{C-Br} \cdots \text{H}_2\text{O}) = 148.95^\circ$. C: $d(\text{I} \cdots \text{H}_2\text{O}) = 3.71 \text{ \AA}$, $\sigma\text{-hole}$ -Winkel $\alpha(\text{C-I} \cdots \text{H}_2\text{O}) = 142.69^\circ$.

Die *docking*-Ergebnisse wurden auch bezüglich einer möglichen Halogenbindung zwischen Wasser und dem 7-Halogensubstituenten untersucht. In allen Versuchen ist der Substituent in Richtung des Wassermoleküls orientiert. Allerdings beträgt der Abstand zwischen den Halogensubstituenten und Wasser 3.7 \AA bis 4.5 \AA und der $\sigma\text{-hole}$ -Winkel liegt zwischen 142° und 149° . Damit weichen die Werte bereits stark von den idealen Gegebenheiten ab, möglicherweise kommt es aber trotzdem zu einer schwachen Anziehung. Da der Abstand zwischen Iod und Wasser mit 3.71 \AA die kleinste Abweichung von der Summe der van-der-Waals-Radii (3.50 \AA) zeigte, ist ein 7-Iodsubstituent gegebenenfalls am vorteilhaftesten.

Einführung von Substituenten am Indolstickstoff (Position 1)

Um die Einflüsse einer Substitution an Position 1 der Indol-3-carbonitrile zu untersuchen, wurden beispielhaft die Verbindungen **20a** und **20b** in die ATP-Bindetasche von DYRK1A gedockt. Diese Verbindungen tragen einen Bromsubstituenten an Position 7 und entweder einen Methyl- (**20a**) oder Benzylrest (**20b**) an Position 1 (Abbildung 2-11).

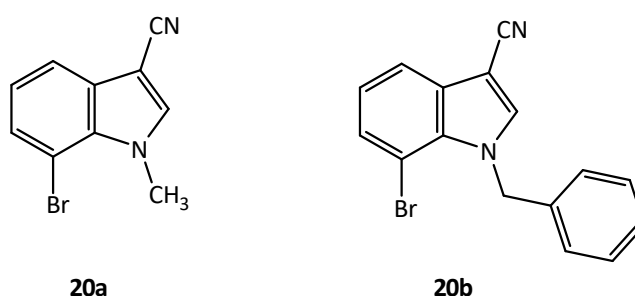


Abbildung 2-11: Struktur der *N*-substituierten Verbindungen **20a** und **20b**

Die *N*-Substitution hat keinen Einfluss auf den grundsätzlichen Bindemodus. Die Oberflächendarstellung der Verbindung **20a** zeigt, dass der Bromsubstituent den vorderen Bereich der Bindetasche gut ausfüllt und der Methylsubstituent in eine kleine Kavität an der Decke

der Bindetasche ragt. Bezüglich einer Halogenbindung führt der zusätzliche Methylsubstituent zu einer Verringerung des Br--H₂O-Abstands auf 3.85 Å und auch der Bindungswinkel zwischen C-Br--H₂O liegt mit 154.89° näher am idealen Winkel von 180°. Somit könnte der Methylsubstituent möglicherweise zu einer verstärkten Halogeninteraktion führen (Abbildung 2-12).

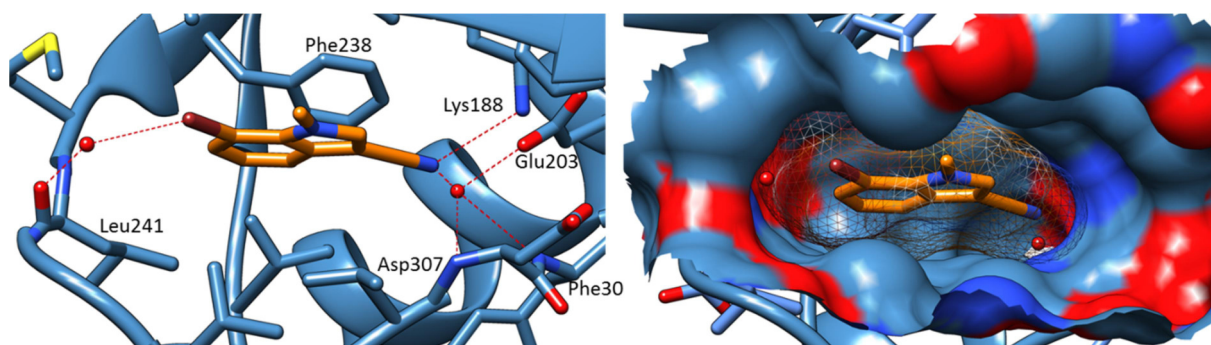


Abbildung 2-12: Ergebnis der *docking*-Experimente mit der *N*-methylierten Verbindung **20a**. Links: Die Darstellung der Seitenketten der Aminosäuren als *sticks*. Rechts: Oberflächendarstellung der Bindetasche und des Liganden **20a**. Dabei ist die von Sauerstoff gebildete Oberfläche rot, die von Stickstoff dunkelblau und die von Kohlen- und Wasserstoff gebildete Oberfläche hellblau gefärbt.

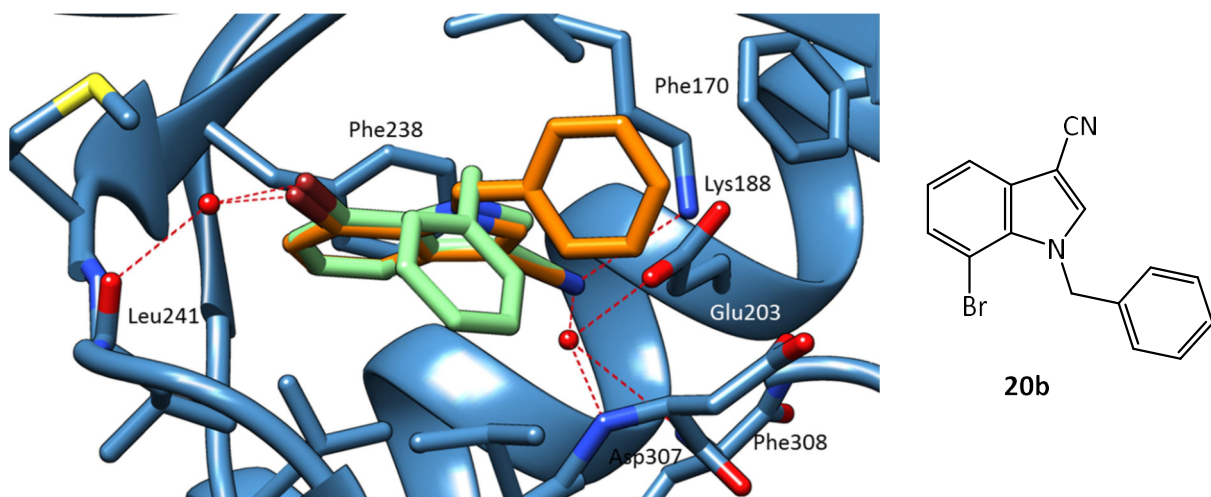


Abbildung 2-13: Überlagerte Darstellung der zwei verschiedenen Posen von **20b** in der Bindetasche von DYRK1A (blau). Bei der am zweithöchsten bewerteten Pose (orange) können möglicherweise aromatische Interaktionen mit der Seitenkette von Phe170 gebildet werden. Der Br--H₂O-Abstand beträgt 3.91–3.98 Å und der σ -hole-Winkel 153.97–154.81°.

Die *docking*-Untersuchungen mit **20b** ergaben zwei Posen auf Platz 1 und 2 des Rankings, in denen der Ligand die gewünschte Orientierung einnahm. Bei beiden Posen liegt der In-

Indolgrundkörper nahezu identisch in der Bindetasche, der Benzylrest an Position 1 ist allerdings anders orientiert (Abbildung 2-13).

Auch der Benzylsubstituent hat im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung **19b** einen positiven Einfluss auf die Bindungsgeometrie der Brom-Wasser-Interaktion. Bei der ersten Pose ist der Benzylsubstituent nach vorne orientiert und füllt eine kleine Kavität am Boden der Bindetasche aus. Bei der zweiten Pose liegt der Benzylsubstituent seitlich in der Bindetasche und füllt diese gut aus. Eventuell sind hier zusätzlich aromatische *edge to face*-Wechselwirkungen mit dem Phenylring von Phe170 möglich (Abbildung 2-14). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass neben einem kleinen Methylrest auch größere Reste am Indolstickstoff Platz in der Bindetasche finden können.

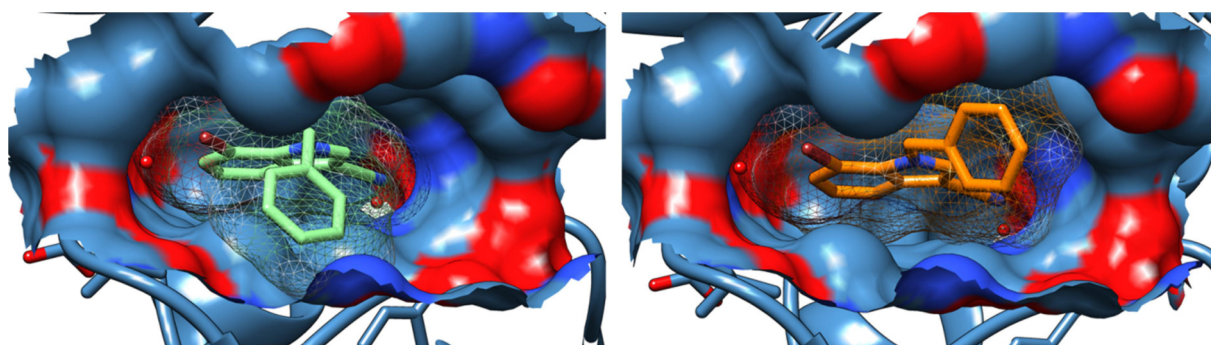


Abbildung 2-14: Oberflächendarstellung der beiden möglichen Orientierungen von **20b** in der ATP-Bindestelle. Die von Sauerstoff gebildete Oberfläche ist rot, die von Stickstoff gebildete Oberfläche dunkelblau und die von Kohlen- und Wasserstoff gebildete Oberfläche hellblau gefärbt. Links: Bei der mit dem höchsten *score* bewerteten Pose (grün) liegt der Benzylsubstituent vorne in der Bindetasche und besetzt eine kleine Kavität am Boden. Rechts: Bei der mit dem zweithöchsten *score* bewerteten Pose (orange) liegt der Benzylsubstituent seitlich in der Bindetasche.

Substitution der Position 2

An der Position 2 des Indolgrundkörpers sollte der Einfluss diverser Substituenten auf den Bindemodus und die Interaktionen mit dem Rezeptor untersucht werden. Zunächst wurde der Einfluss eines Phenylrings an dieser Position sowohl auf die Orientierung in der Bindetasche als auch auf die Halogenbindung zum Wasser analysiert. Das entsprechende 7-Chlor- (**19d**), 7-Brom- (**19e**) und das 7-Iodderivat (**19f**) wurde in die ATP-Bindetasche von DYRK1A gedockt. Auch die Substitution an Position 2 führt nicht zur Veränderung des Bindemodus. Der Halogensubstituent an Position 7 ist jeweils in Richtung der *hinge*-Region orientiert. Neben den hydrophoben Wechselwirkungen des Indolgrundkörpers mit den unpolaren Amino-

säuren am Boden der Bindetasche ermöglicht der 2-Phenylsubstituent eventuell zusätzliche aromatische *edge-to-face*-Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Phe170. Dies könnte die Affinität zum Protein erhöhen, was sich auch in einem erhöhten *chemscore* im Vergleich zu den unsubstituierten Verbindungen **19a–c** ausdrückt (37.62–41.46 für **19d–f** im Vergleich zu 31.96–32.59 für **19a–c**). In Hinblick auf eine wasservermittelte Halogenbindung zwischen dem Substituenten in Position 7 und der *hinge*-Region führt der zusätzliche Phenylsubstituent sowohl zu einer Verringerung des Hal–H₂O-Abstandes als auch zu einer Annäherung des σ -hole-Winkels an den geforderten Wert von 180° (Abbildung 2-15). Die 7-Iodverbindung **19f** erfüllt die Anforderungen an Halogenbindungen mit einem I–H₂O-Abstand von 3.57 Å und einem C–I–H₂O-Winkel von 169.89° am besten, sodass der Iodsubstituent möglicherweise die Aktivität der Inhibitoren im Vergleich zu 7-Chlor- und 7-Bromsubstituenten positiv beeinflusst. Da in der Berechnung der *chemscore function* keine Halogenbindungen berücksichtigt werden, drückt sich dies nicht im *fitness score* aus.

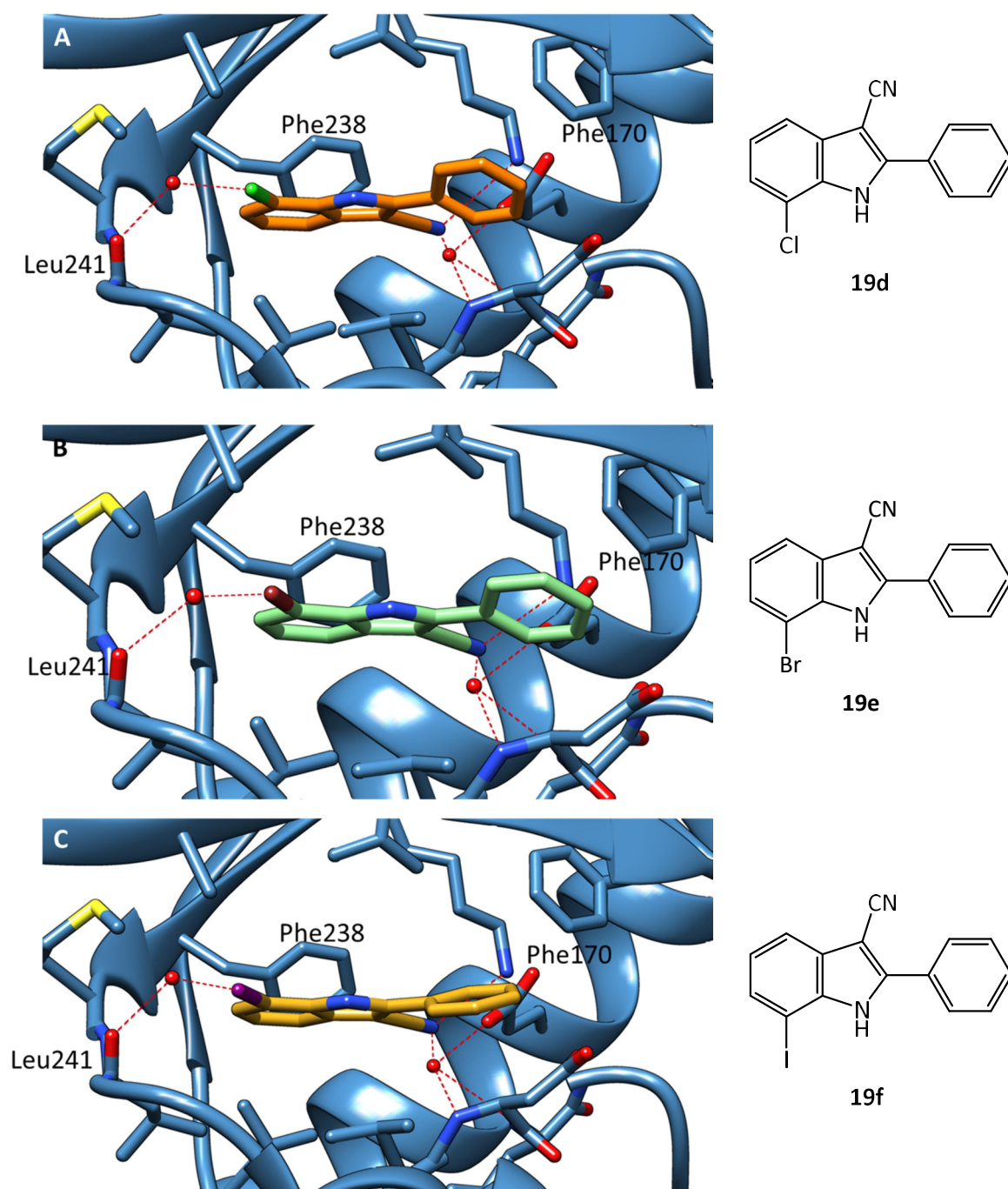


Abbildung 2-15: Ergebnisse der *docking*-Studien mit den 2-Phenylverbindungen **19d–f**. Der Phenylsubstituent erlaubt möglicherweise zusätzliche aromatische Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Phe170. A: *docking*-Pose der 7-Chlorverbindung **19d** (orange); $d(\text{Cl-H}_2\text{O}) = 4.40 \text{ \AA}$, $\sigma\text{-hole}$ -Winkel $\alpha(\text{C-Cl-H}_2\text{O}) = 166.60^\circ$. B: *docking*-Pose der 7-Bromverbindung **19e** (grün); $d(\text{Br-H}_2\text{O}) = 3.85 \text{ \AA}$, $\sigma\text{-hole}$ -Winkel $\alpha(\text{C-Br-H}_2\text{O}) = 162.04^\circ$. C: *docking*-Pose der 7-Iodverbindung **19f** (gelb); $d(\text{I-H}_2\text{O}) = 3.57 \text{ \AA}$, $\sigma\text{-hole}$ -Winkel $\alpha(\text{C-I-H}_2\text{O}) = 169.89^\circ$; die Geometrie der Iod-Wasser-Interaktion erfüllt beinahe die idealen Anforderung an Halogenbindungen mit einem Abstand von 3.50 \AA und einem $\sigma\text{-hole}$ -Winkel von 180° .

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Einführung zusätzlicher Reste am Phenylring an Position 2 des Indols möglich ist und auch zur Erzeugung des gewünschten Bindemodus führt. Die *para*-Methoxyverbindung **19g** liegt analog zur unsubstituierten Verbindung **19f** in der Bindetasche. Der *para*-Methoxyphenylsubstituent füllt die seitliche Bindetasche gut aus und die Methoxygruppe ragt in Richtung des Lösemittels aus der Bindetasche heraus (Abbildung 2-16).

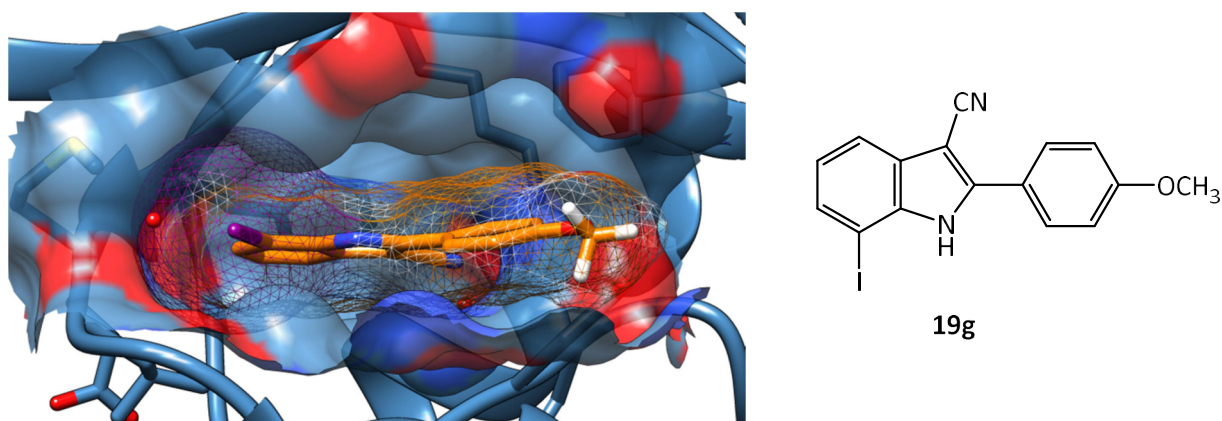


Abbildung 2-16: Oberflächendarstellung der *docking*-Pose der Verbindung **19g** mit einem *para*-Methoxyphenylsubstituenten in Position 2 des Indols. Dabei ist die von Sauerstoff gebildete Oberfläche rot, die von Stickstoff dunkelblau und die von Kohlen- und Wasserstoff gebildete Oberfläche hellblau gefärbt

Bei *docking*-Experimenten mit der Verbindung **19h**, die einen *meta*-Methoxyphenylsubstituenten in Position 2 trägt, wurden von GOLD zwei Posen generiert, in denen der Indolgrundkörper die gewünschte Orientierung einnimmt. Diese Posen wurden auf Platz 1 und 2 des Rankings von *chemscore* gesetzt. Bei der am höchsten bewerteten Pose liegt der Phenylsubstituent seitlich in der Bindetasche und der Methoxysubstituent ragt nach vorne und füllt eine kleine Kavität an der Decke der Bindetasche aus. Alternativ kann der Phenylring auch so ausgerichtet werden, dass der *meta*-Methoxysubstituent in Richtung der Lösemittel zugewandten Seite ragt (Abbildung 2-17). Die ATP-Bindetasche von DYRK1A bietet somit ausreichend Platz für eine weitere Substitution am Phenylring.

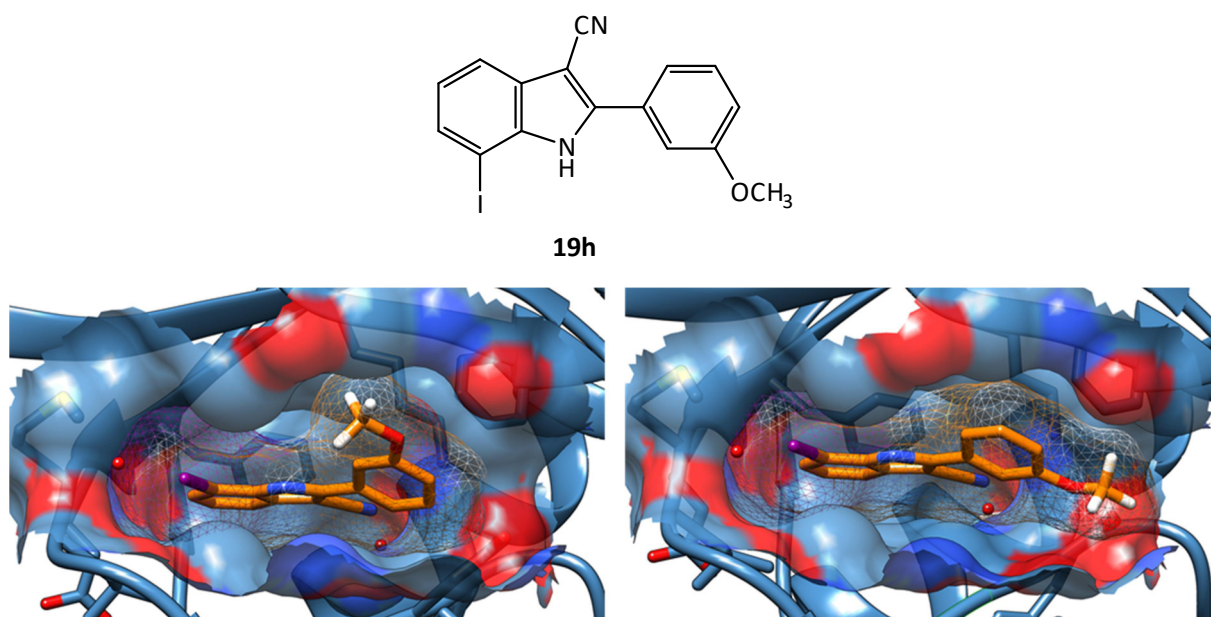


Abbildung 2-17: *docking*-Posen der Verbindung **19h** in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Die von Sauerstoff gebildete Oberfläche ist rot, die von Stickstoff gebildete Oberfläche dunkelblau und die von Kohlen- und Wasserstoff gebildete Oberfläche hellblau gefärbt. Links: Bei der am höchsten bewerteten Pose ragt die *m*-Methoxygruppe in eine Kavität an der Decke der Bindetasche. Rechts: Bei der zweiten Pose liegt die Methoxygruppe seitlich und ist in Richtung der Lösemittel zugänglichen Seite orientiert.

Auch der Austausch des Phenylsubstituenten gegen verschiedene aliphatische Reste an Position 2 des Indolkörpers führte zur Generierung des gewünschten Bindemodus der Liganden in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Dabei ist auffällig, dass der größere Cyclopentylrest von **19i** die Seitentasche deutlich besser ausfüllt als die kleineren Reste von **19j** und **19k** (Abbildung 2-18). Dies drückt sich auch im *chemscore* der Posen aus. Während die Pose der Verbindung **19i** mit einem *score* von 36.21 bewertet wird, werden die Posen von **19j** und **19k** schlechter bewertet (33.38 bzw. 33.45).

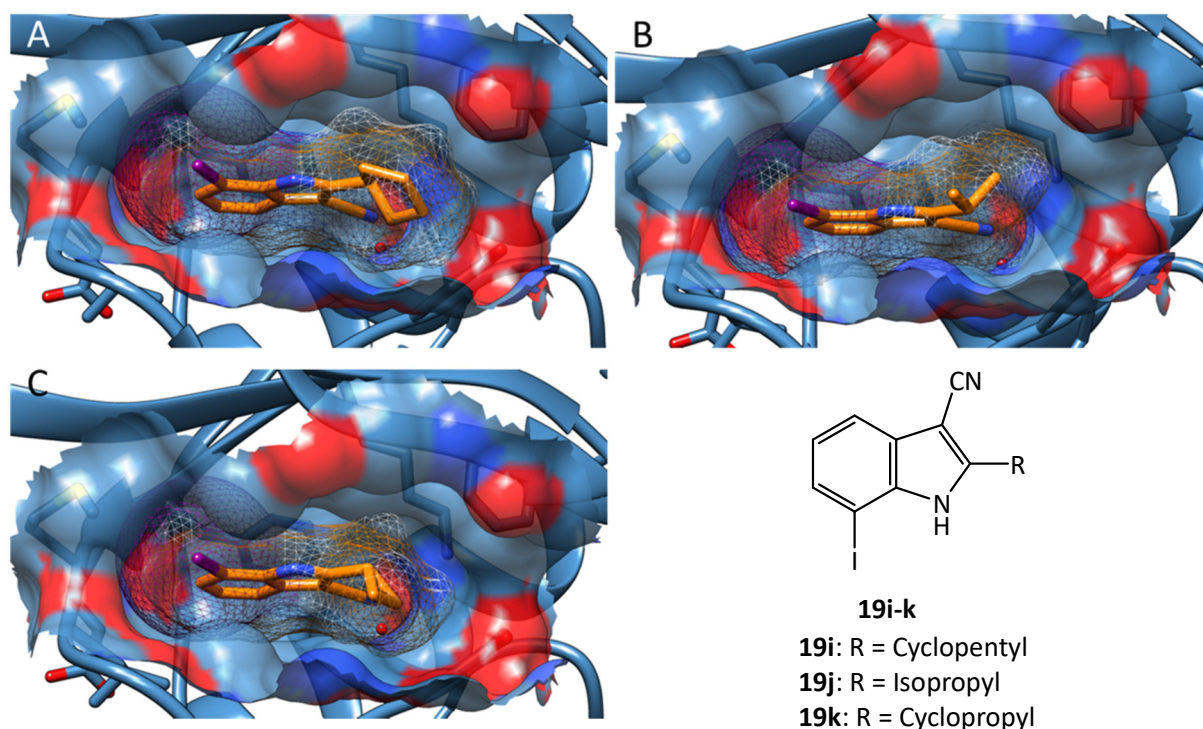


Abbildung 2-18: *docking*-Posen der Verbindungen **19i–k** mit aliphatischen Resten an Position 2. Die von Sauerstoff gebildete Oberfläche ist rot, die von Stickstoff gebildete Oberfläche ist dunkelblau und die von Kohlen- und Wasserstoff gebildete Oberfläche hellblau gefärbt. Die Liganden sind in orange dargestellt. A: Der 2-Cyclopentylrest der Verbindung **19i** füllt die seitliche Bindetasche gut aus. B/C: Durch die kleineren 2-Isopropyl- bzw. 2-Cyclopropylreste der Verbindungen **19j–k** wird die seitliche Bindetasche nicht optimal ausgefüllt.

Die Verbindung **21** mit einer 2,3-Dihydroxypropylseitenkette wurde beispielhaft in die Bindetasche gedockt, um zu untersuchen, ob auch polare Reste an Position 2 des Indols toleriert werden. Der Dihydroxypropylsubstituent ist nach vorne orientiert und die Hydroxylgruppen ermöglichen neben der bekannten Interaktion mit Lys188 weitere polare Wechselwirkungen mit dem Protein. Die 2-OH-Gruppe formt eine Wasserstoffbrückenbindung zur Seitenkette von Asn292 und die 3-OH-Gruppe interagiert mit der Seitenkette von Asn244 und mit dem *backbone*-Carbonylsauerstoffatom von Glu291 (Abbildung 2-19).

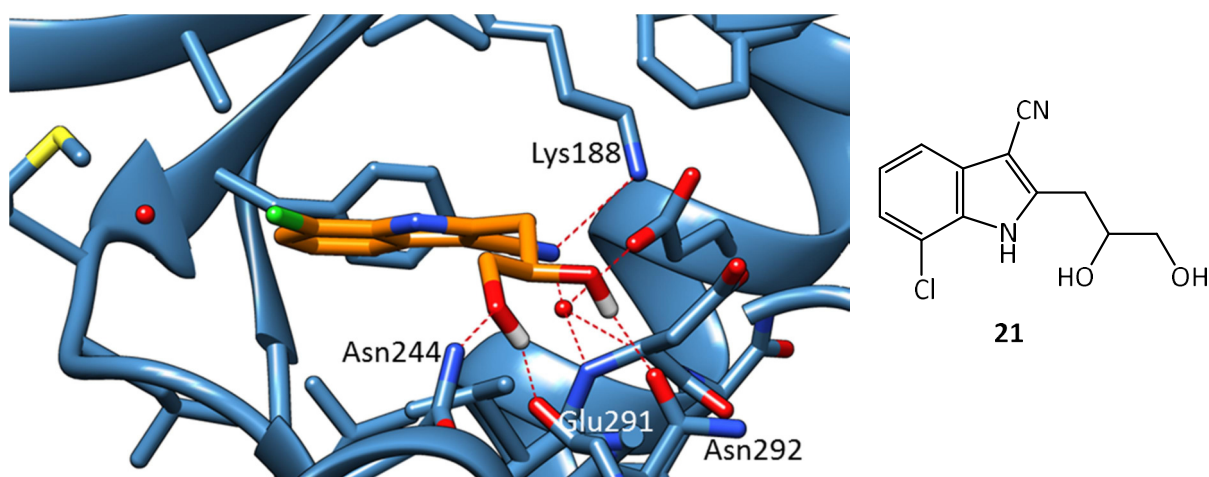


Abbildung 2-19: Bindemodus der Verbindung **21** in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Die 2,3-Dihydroxypropylseitenkette ermöglicht zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zu Asn244, Glu291 und Asn292.

Abschließend kann festgestellt werden, dass basierend auf den *docking*-Ergebnissen viele verschiedene Substituenten an Position 2 des Indolgrundkörpers toleriert werden. Viersprechend erscheinen aromatische Substituenten, da sie zusätzliche aromatische Interaktionen ermöglichen. Aber auch polare Reste führten in den *docking*-Studien zu sinnvollen und gut bewerteten Posen und sollten daher in den Synthesen berücksichtigt werden.

2.5 Docking in verwandte Kinasen

Vor allem die ATP-Bindetaschen von DYRK1B und CLK1 weisen eine große Ähnlichkeit zur Bindestelle von DYRK1A auf. Daher wurde beispielhaft das 7-Iod-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (**19f**) in diese Kinasen gedockt, um mögliche Anhaltspunkte für das Design selektiver Inhibitoren zu erhalten.

DYRK1B

Da von DYRK1B keine experimentell ermittelte Co-Kristallstruktur vorhanden ist, wurde mit dem Programm Modeller¹¹⁰ basierend auf der Kristallstruktur 4AZE⁶² von DYRK1A ein Homologiemodell erstellt. Dazu wurde eine in UCSF Chimera¹⁴⁸ integrierte Benutzeroberfläche verwendet und die Modellerstellung mit den vorgegebenen Standardeinstellungen durchgeführt. Bei den *docking*-Untersuchungen mit **19f** wurde zwar der gleiche Bindemodus wie in DYRK1A erzeugt, allerdings kommt es im vorderen Bereich der Bindetasche zu einer leichten Kollision der Oberfläche des 7-Iodsubstituenten mit der Proteinoberfläche (Abbildung

2-20_A). Möglicherweise führt dies zu einer gewissen Selektivität für DYRK1A gegenüber DYRK1B.

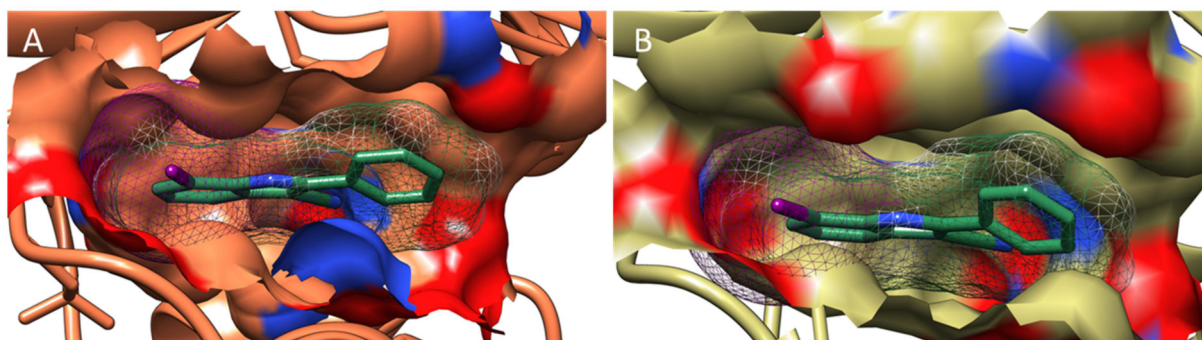


Abbildung 2-20: Ergebnis des *dockings* von der Verbindung **19f** (grün) in die ATP-Bindetasche von DYRK1B (A, orange) und CLK1 (B, olivgrün, PDB: 2VAG⁸⁶).

CLK1

Auch in der Bindetasche von CLK1 nimmt **19f** die gleiche Orientierung ein wie in DYRK1A (Abbildung 2-20_B). Aufgrund der kleineren Bindetasche von CLK1 kommt es aber zu einem *clash* zwischen dem Iodsubstituenten und der Oberfläche des Proteins. Der 2-Phenylsubstituent findet Platz in der seitlichen Bindetasche. Da die Tasche dort in Richtung der Lösemittel zugewandten Seite allerdings stärker geschlossen ist als bei DYRK1A, sind die Möglichkeiten für weitere Reste am Phenylring möglicherweise eingeschränkt, sodass so eine Selektivität erreicht werden könnte.

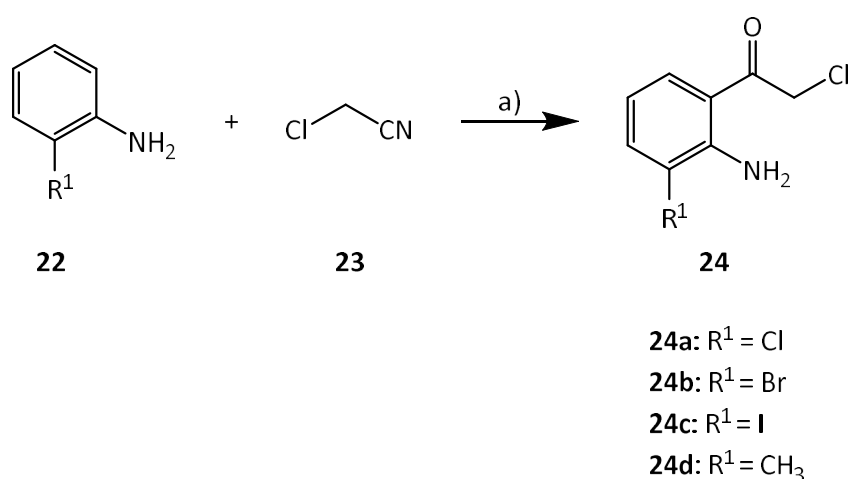
3 Synthese

Basierend auf den Ergebnissen der *docking*-Studien sollten Indol-3-carbonitrile mit verschiedenen Substituenten am Indolstickstoff sowie an den Positionen 2 und 7 des Indols synthetisiert werden. 7-Halogenierte Indole, die als Ausgangsverbindungen für die Synthese der Substanzen **19a–c** und einiger *N*-substituierter Verbindungen dienten, konnten käuflich erworben werden. Die 2-substituierten Indole dagegen wurden zunächst in einer zweistufigen Synthesesequenz nach *Pei et al.*^{111, 112} dargestellt. Anschließend folgte bei allen Verbindungen die Einführung der Nitrilgruppe an Position 3 des Indols. Für diesen Reaktionsschritt wurden drei verschiedene Synthesewege entwickelt.

3.1 Synthese der 2-substituierten Indole

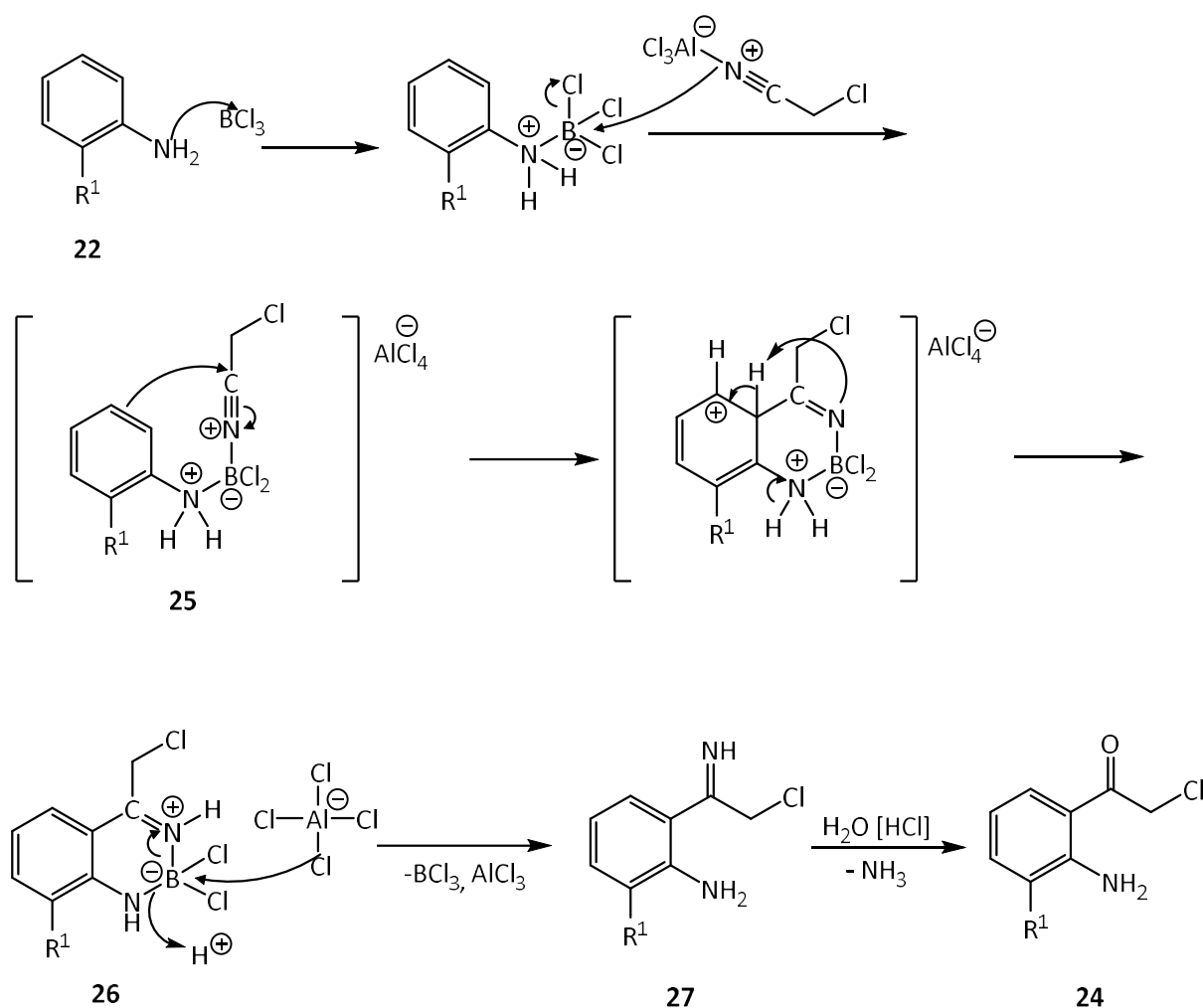
3.1.1 Synthese von 3-substituierten 1-(2-Aminophenyl)-2-chlorethan-1-onen

Als Ausgangsverbindung für die Synthese der Indole dienten 2-Chlor-1-phenylethanon-Derivate, die zunächst synthetisiert werden mussten. Dazu wurden die *ortho*-substituierten Anilinderivate **22** in einer Sugasawa-Reaktion katalysiert durch Aluminiumtrichlorid und Bortrichlorid in Dichlormethan mit Chloracetonitril (**23**) zu den 3-substituierten 1-(2-Aminophenyl)-2-chlorethan-1-on-Derivaten **24a–d** umgesetzt (Schema 3-1).^{112, 113}



Schema 3-1: Darstellung der 2-Chlor-1-(2-aminophenyl)ethan-1-one **24** aus 2-substituierten Anilinen **22** und Chloracetonitril (**23**) in einer Sugasawa-Reaktion. a) 1. AlCl₃, BCl₃, CH₂Cl₂, 0 °C → Reflux, 7–23 h; 2. 2M HCl, Reflux, 30 min, 17–62%.

Aniline können nicht nach der Friedel-Crafts-Acylierung mit Carbonsäurechloriden umgesetzt werden, da das freie Elektronenpaar des Stickstoffs mit der eingesetzten Lewis-Säure reagiert und nicht der Aromat, sondern die Aminogruppe acyliert wird. Da aus dem gleichen Grund auch Phenole nicht direkt in einer Friedel-Crafts-Reaktion acyliert werden können, wurde bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts die Houben-Hoesch-Reaktion entwickelt, bei der Phenole und Derivate mit organischen Nitrilen unter Katalyse von Salzsäure und einer Lewis-Säure acyliert werden.^{114, 115}



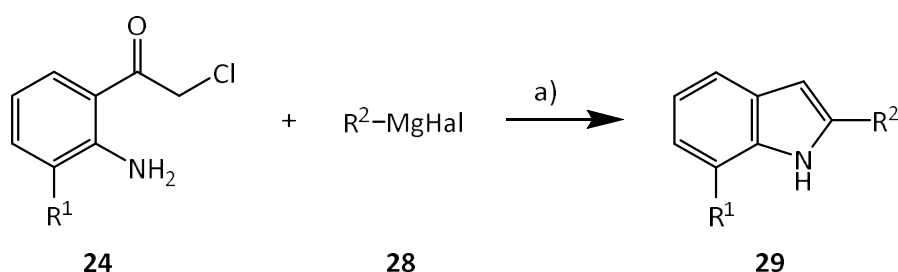
Schema 3-2: Mechanismus der regioselektiven Reaktion von Anilinen mit organischen Nitrilen. Modifiziert nach DOUGLAS *et al.*¹¹⁶

Eine analoge Reaktion für Aniline wurde zum ersten Mal 1978 von SUGASAWA *et al.* beschrieben.¹¹³ Die Kombination von Bortrichlorid und Aluminiumtrichlorid führte dabei zu den bes-

ten Ausbeuten. Die Reaktion verläuft regioselektiv in *ortho*-Position zur Aminogruppe und es kommt nicht zur Bildung der *para*-substituierten Derivate. Bei der Reaktion des Anilins mit dem Nitril entsteht zunächst das entsprechende Imin, das durch Aufarbeitung mit wässriger Salzsäure zum gewünschten Keton hydrolysiert wird.¹¹³ Der entsprechende Mechanismus wurde 1994 von DOUGLAS *et al.* aufgeklärt (Schema 3-2).¹¹⁶ Dabei greift zunächst das freie Elektronenpaar des Anilins an der Lewis-Säure Bortrichlorid an und das Nitril bildet einen Komplex mit Aluminiumtrichlorid. Im nächsten Schritt greift das Nitrilstickstoffatom am Boratom an und ein Chloridion wird auf Aluminiumtrichlorid übertragen, sodass sich der Komplex **25** bildet. Durch einen elektrophilen Angriff des Nitrilkohlenstoffatoms am Aromaten bildet sich ein sechsgliedriger Ring in der Zwischenstufe **26** aus. Die Abspaltung der Katalysatoren Bortrichlorid und Aluminiumtrichlorid führt anschließend zur Bildung des Imins **27**. Dieses wird durch saure Hydrolyse zum gewünschten Produkt **24** umgesetzt. Durch die Komplexierung des Anilins und des Nitrils durch den Katalysator Bortrichlorid in der Zwischenstufe **25** kann der Angriff des Aromaten am elektrophilen Kohlenstoffatom des Nitrils nur in *ortho*-Position zur Aminogruppe des Anilin erfolgen, was die hohe Regioselektivität dieser Reaktion erklärt.

3.1.2 Darstellung von 2-substituierten Indolen

Die 2-substituierten Indole **29** wurden nach der Vorschrift von PEI *et al.* in einer Grignard-Reaktion synthetisiert.¹¹¹ Dazu wurden die im ersten Schritt dargestellten 1-(2-Aminophenyl)-2-chlorethan-1-on-Derivate **24a–d** mit den entsprechenden Grignard-Reagenzien **28** umgesetzt (Schema 3-3). Die Reaktion verläuft zügig unter milden Bedingungen bei Raumtemperatur.



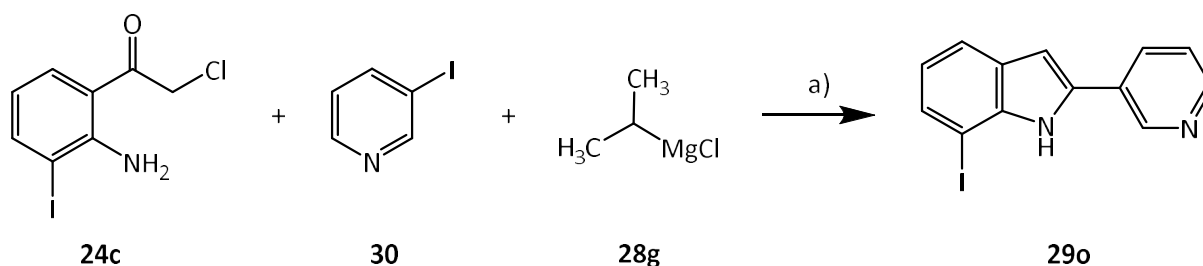
Schema 3-3: Synthese der 2-substituierten Indole **29** in einer Grignard-Reaktion ausgehend von den Verbindungen **24**. a) THF oder Toluol, $-10\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 60 min, 22–92%.

Die Grignard-Reagenzien **28** konnten käuflich erworben werden und ermöglichten die Einführung diverser aromatischer und aliphatischer Reste an Position 2 des Indolgrundkörpers (Tabelle 3-1). Die Ausbeuten der Reaktion waren stark abhängig von den eingesetzten Edukten. Im Allgemeinen führte das 3'-Chlorderivat **24a** in Kombination mit aromatischen Grignard-Reagenzien zu den besten Ausbeuten. Beispielsweise konnte **24a** mit Phenylmagnesiumchlorid (**28a**) fast vollständig umgesetzt werden und lieferte eine Ausbeute von 92 %.

Tabelle 3-1: Strukturen der 2-substituierten Indole **29** und Reaktionsausbeuten.

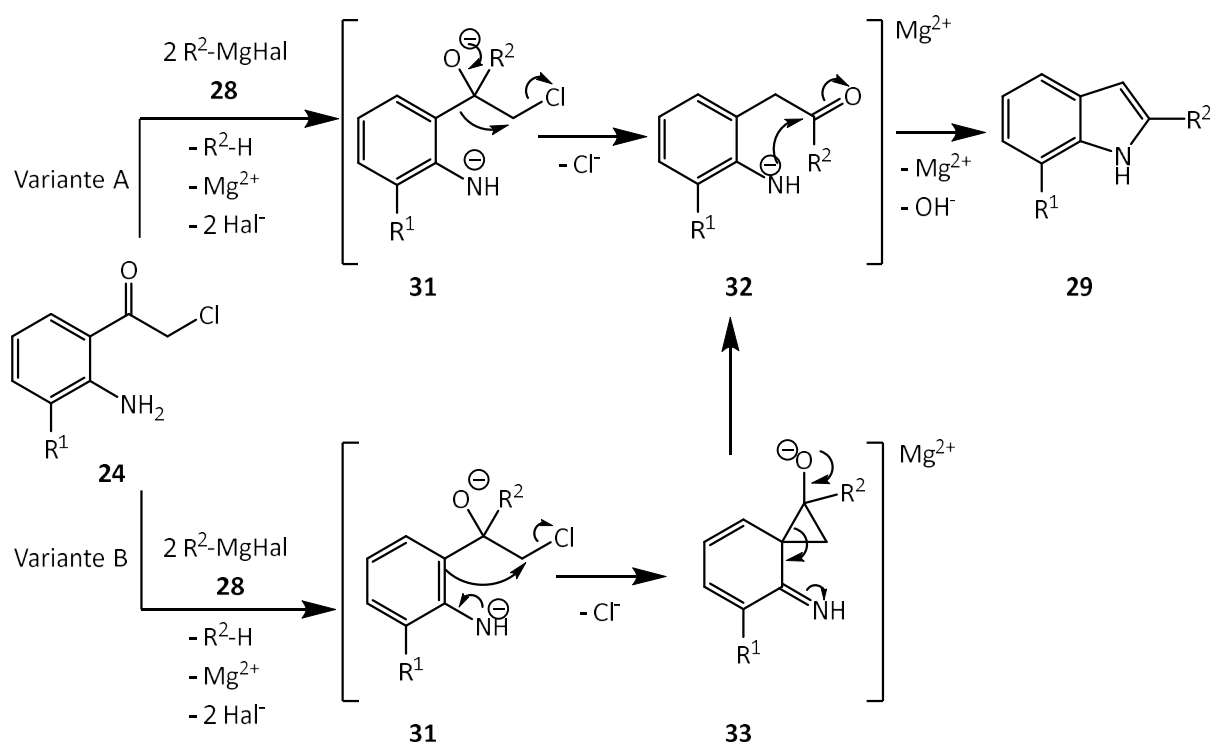
	R ¹	R ²	Ausbeute
29a	Cl	Phenyl	92%
29b	Br	Phenyl	84%
29c	I	Phenyl	57%
29d	CH ₃	Phenyl	52%
29e	Cl	4-Cl-Phenyl	45%
29f	Cl	4-H ₃ CO-Phenyl	69%
29g	Cl	Allyl	49%
29h	Cl	2-(1,3-Dioxan-2-yl)ethyl	60%
29i	I	4-Cl-Phenyl	23%
29j	I	4-H ₃ CO-Phenyl	22%
29k	I	3-H ₃ CO-Phenyl	58%
29l	I	Isopropyl	32%
29m	I	Cyclopropyl	28%
29n	I	Cyclopentyl	29%

Neben der Synthese der Indole **29a–n** mit käuflich verfügbaren Grignard-Verbindungen konnte auch 7-Iod-2-(pyridin-3-yl)-1*H*-indol (**29o**) dargestellt werden. Dafür wurde 3-Pyridinylmagnesiumchlorid *in situ* aus 3-Iodpyridin (**30**) und Isopropylmagnesiumchlorid (**28g**) durch Austausch der organischen Reste erzeugt (Schema 3-4). 3-Pyridinylmagnesiumchlorid reagierte dann entsprechend des beschriebenen Mechanismus zum gewünschten Indol **29o**.



Schema 3-4: Synthese von 7-Iod-2-(pyridin-3-yl)-1H-indol (**29o**). a) THF, 0 °C → RT, 2 h, 24%.

Die Synthese der Indole verläuft hoch regioselektiv, es kommt ausschließlich zur Bildung der 2-substituierten Derivate. Daher haben Pei *et al.* einen Mechanismus zur Erklärung dieser Regioselektivität postuliert (Schema 3-5).



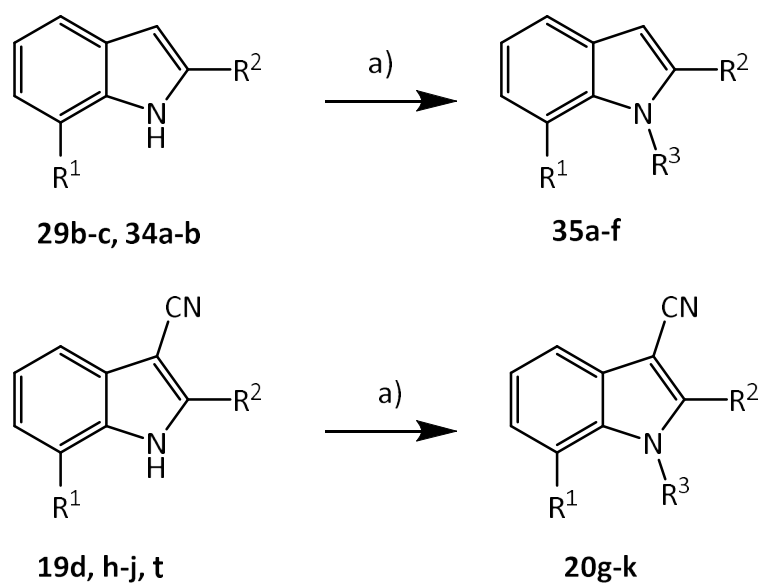
Schema 3-5: Postulierter Mechanismus zur Erklärung der Regioselektivität der Reaktion von **24** mit den Grignard-Verbindungen **28** zur Bildung von 2-substituierten Indolen **29**.
Modifiziert nach Pei *et al.* ^{111, 112}

Für die Reaktion werden zwei Äquivalente der Grignard-Reagenzien **28** eingesetzt. Ein Äquivalent wird zur Deprotonierung der Aminogruppe benötigt und das zweite Äquivalent greift

nucleophil am Carbonylkohlenstoffatom der Ketofunktion des 2-Chlor-1-phenylethanon-Derivats **24** an, sodass sich die Zwischenstufe **31** bildet. Für den weiteren Reaktionsverlauf schlagen PEI *et al.* zwei Varianten vor. Entweder kommt es zu einer [1,2]-anionotropen Umlagerung, bei der der aromatische Ring unter Chloridabspaltung auf die Position 2 der Seitenkette übertragen wird und sich das Keton **32** bildet. Durch anschließende nucleophile Addition des Anilinstickstoffatoms am Carbonylkohlenstoffatom kommt es zum Ringschluss und durch Wasserabspaltung wird das gewünschte Indol **29** gebildet (Variante A). Alternativ kann sich ausgehend von der Zwischenstufe **31** durch den nucleophilen Angriff eines Elektronenpaares des Aromaten am C2-Kohlenstoffatom und Abspaltung eines Chloridions das spirozyklische Intermediat **33** bilden (Variante B). Dieses reagiert anschließend weiter zum Keton **32** und analog zur Variante A wird durch die nucleophile Addition am Keton und folgende Kondensation das Indol **29** gebildet.^{111, 112}

3.2 Einführung von Substituenten am Indolstickstoff

Zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen sollten am Indolstickstoff substituierte Derivate dargestellt werden, da diese auch in den *docking*-Untersuchungen sinnvolle Ergebnisse lieferten. Es wurden sowohl verschiedene *N*-methylierte Verbindungen synthetisiert als auch die beiden Verbindungen **20b** und **20d**, die jeweils einen Benzylrest in Position 1 des Indols tragen. Die Synthese der *N*-substituierten Verbindungen verlief ausgehend von den unsubstituierten Indolen. Diese wurden nach Deprotonierung durch die Base Natriumhydrid in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit Iodmethan oder Benzylbromid umgesetzt (Schema 3-6). Entweder wurden zunächst die *N*-substituierten Indole **35** dargestellt, die anschließend mit den in Kapitel 3.3 beschriebenen Methoden zu den *N*-substituierten Indol-3-carbonitrilen **20a–f** umgesetzt wurden. Alternativ erfolgte die *N*-Methylierung der Indol-3-carbonitrile **19d**, **19h–j** und **19t**.



Schema 3-6: Darstellung der *N*-substituierten Indole **35a–f** und der *N*-substituierten Indol-3-carbonitrile **20g–k**. a) NaH, Iodmethan oder Benzylbromid, THF oder DMF, 0 °C → RT, 4.5–48 h, 12–78%.

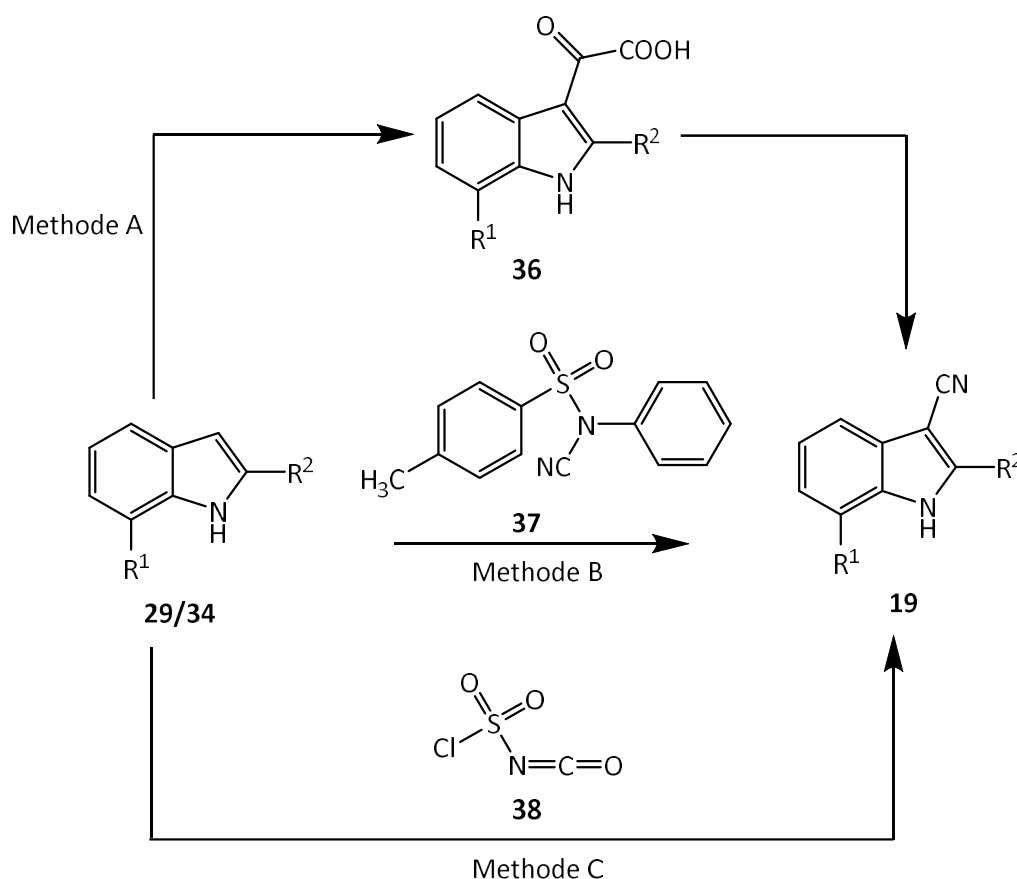
Tabelle 3-2: Strukturen der *N*-substituierten Indole **35** und der *N*-methylierten Indol-3-carbonitrile **20g–k**.

	R ¹	R ²	R ³
35a	Br	H	CH ₃
35b	Br	H	Benzyl
35c	Cl	H	CH ₃
35d	Cl	H	Benzyl
35e	Br	Phenyl	CH ₃
35f	I	Phenyl	CH ₃
20g	H	Phenyl	CH ₃
20h	Cl	Phenyl	CH ₃
20i	I	3-H ₃ CO-Phenyl	CH ₃
20j	I	Isopropyl	CH ₃
20k	I	Cyclopentyl	CH ₃

3.3 Synthese der Endstufen

3.3.1 Einführung der Nitrilgruppe

Nach der Synthese der 2-substituierten Indole **29** folgte die Einführung der Nitrilgruppe an Position 3 der Indole. Für diesen Schritt wurden drei verschiedene Methoden entwickelt. Methode A ist ein zweistufiges Verfahren mit 2-(Indol-3-yl)-2-oxoessigsäure-Derivaten **36** als Intermediaten. Nach den Methoden B und C wird die Nitrilgruppe in einer einstufigen Reaktion mit den Reagenzien *N*-Cyan-*N*-phenyl-*p*-toluensulfonamid (**37**, NCTS, Methode B) oder Chlorsulfonylisocyanat (**38**, Methode C) eingeführt (Schema 3-7).

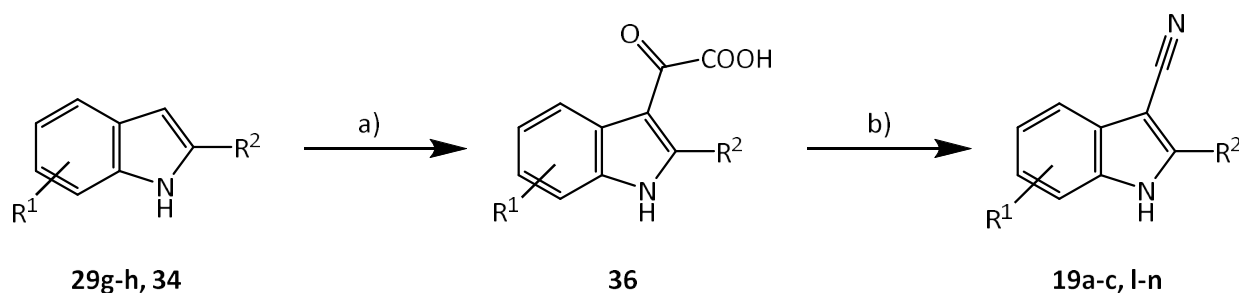


Schema 3-7: Übersicht über die drei verschiedenen Methoden, die zur Einführung der Nitrilgruppe an Position 3 der 2-substituierten Indole **29** und der unsubstituierten Indole **34** angewandt wurden.

Einführung der Nitrilgruppe in einer zweistufigen Reaktion (Methode A)

Das 7-Chlor-1*H*-indol-3-carbonitril (**19a**) wurde bereits von FALKE synthetisiert.¹¹⁷ Dazu wurde im ersten Schritt 7-Chlorindol (**34a**), das käuflich erworben wurde, mit Oxalylchlorid umgesetzt. Durch eine Friedel-Crafts-Acylierung wurde das 2-Oxoessigsäurederivat **36a** gewonnen, das isoliert und als Edukt für die folgende Reaktion zur Bildung des Nitrils eingesetzt

wurde. Diese Synthesemethode wurde analog zur Darstellung der Indol-3-carbonitrile **19b–c** und **19l–n** ausgehend von den 2-substituierten Indolen **29g–h** und den an Position 2 unsubstituierten Indolen **34** angewandt (Schema 3-8 und Tabelle 3-3).

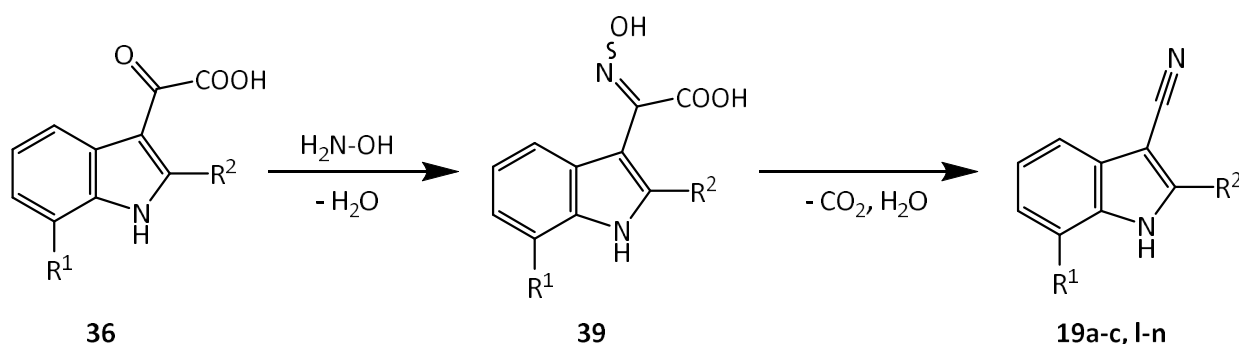


Schema 3-8: Synthese der Indol-3-carbonitrile **19** nach einer zweistufigen Methode mit den 2-Oxoessigsäurederivaten **36** als isolierten Intermediaten. a) 1. Oxalylchlorid, Diethylether, RT, 1.5–6 h; 2. NaHCO₃ oder NaOH, H₂O, 9–83%. b) H₂N-OH•HCl, Natriumacetat, H₂O/Ethanol, Reflux, 7–9 h, 6–49%.

Tabelle 3-3: Strukturen der nach Methode A dargestellten Indol-3-carbonitrile **19a–c** und **19l–n**

	R ¹	R ²
19a	7-Cl	H
19b	7-Br	H
19c	7-I	H
19l	7-Cl	Allyl
19m	7-Cl	2-(1,3-Dioxan-2-yl)ethyl
19n	5-I	H

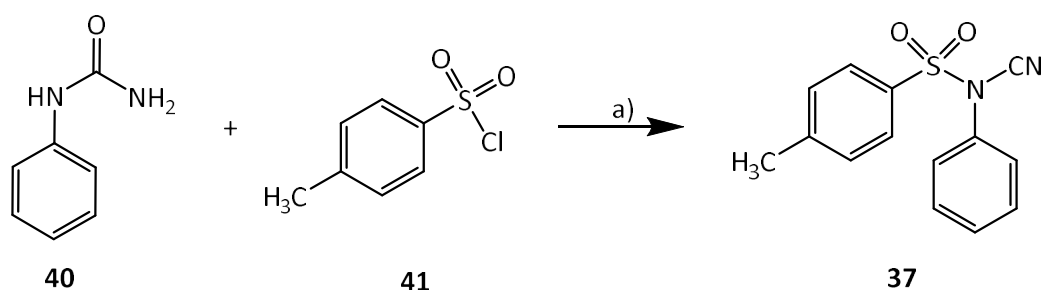
Die 2-(Indol-3-yl)-2-oxoessigsäuren **36** wurden nach der Vorschrift von FALKE mit Hydroxylamin-Hydrochlorid und Natriumacetat in einem Ethanol-Wasser-Gemisch refluxiert.¹¹⁷ Dabei entsteht durch Reaktion der Ketofunktion von **36** mit Hydroxylamin vermutlich zunächst das Oxim **39**, aus dem durch die Abspaltung von Wasser und Kohlenstoffdioxid die gewünschte Nitrilgruppe gebildet wird (Schema 3-9).^{117, 118}



Schema 3-9: Möglicher Mechanismus der Bildung der Nitrile **19** aus den 2-Oxocarbonsäuren **36** mit einem Oxim als Zwischenstufe nach FALKE¹¹⁷ und BORSCHÉ¹¹⁸.

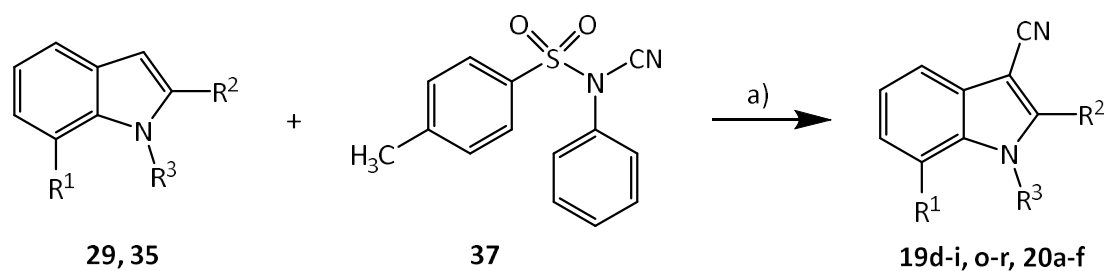
Einführung der Nitrilgruppe mit dem Reagenz *N*-Cyan-*N*-phenyl-*p*-toluensulfonamid (Methode B)

Da die zweistufige Synthese der Methode A zur Einführung der Nitrilgruppe zu schlechten Ausbeuten (4–30 %) der Indol-3-carbonitrile **19** bezogen auf die eingesetzten Mengen der Indole **29** und **34** führte, wurden alternative Methoden entwickelt. Diese sollten eine direkte Einführung der Nitrilgruppe an Position 3 der 2-substituierten Indole **29** und der *N*-substituierten Indole **35** ermöglichen und damit zu besseren Ausbeuten führen.



Schema 3-10: Darstellung von NCTS (**37**) aus *N*-Phenylharnstoff (**40**) und Tosylchlorid (**41**). a) Pyridin, RT, 30 min, 65%.

In der ersten alternativ entwickelten Methode wurde dazu nach einer Vorschrift von YANG *et al.* das Reagenz *N*-Cyan-*N*-phenyl-*p*-toluensulfonamid (NCTS, **37**) verwendet.¹¹⁹ NCTS ist ein elektrophiles Reagenz und leicht synthetisch zugänglich. Es wurde unter milden Reaktionsbedingungen und mit moderater Ausbeute (65 %) aus Phenylharnstoff (**40**) und Tosylchlorid (**41**) gewonnen (Schema 3-10).¹²⁰



Schema 3-11: Synthese der Indol-3-carbonitrile **19** und der *N*-substituierten Verbindungen **20** nach Methode B mit dem Reagenz NCTS (**37**). a) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, 1,2-Dichlorethan, 100 °C (Ölbadtemperatur), 18–48 h, 13–71%.

Für die Darstellung der Indol-3-carbonitrile **19** und **20** wurden die Indole **29** und **35** jeweils zusammen mit NCTS (**37**) in 1,2-Dichlorethan erhitzt. Die Reaktion wurde durch die Lewis-Säure Bortrifluoriddiethyletherat katalysiert (Schema 3-11). Bei der Reaktion wird die Nitrilgruppe von NCTS in einer elektrophilen Substitution am Aromaten auf die Position 3 des Indols übertragen.

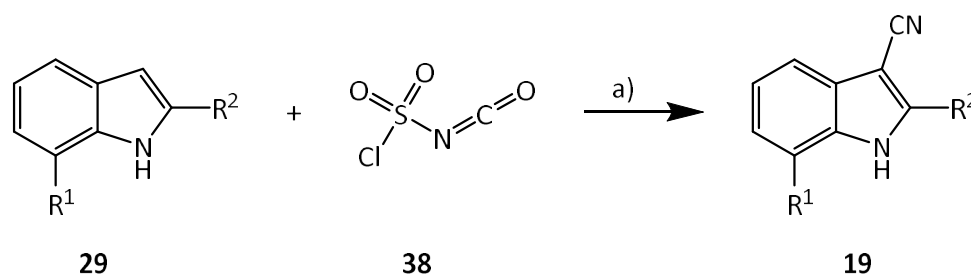
Tabelle 3-4: Strukturen der nach Methode B synthetisierten Indol-3-carbonitrile **19** und **20**.

	R^1	R^2	R^3
19d	Cl	Phenyl	H
19e	Br	Phenyl	H
19f	I	Phenyl	H
19g	I	4- H_3CO -Phenyl	H
19h	I	3- H_3CO -Phenyl	H
19i	I	Cyclopentyl	H
19o	CH_3	Phenyl	H
19p	Cl	4- H_3CO -Phenyl	H
19q	Cl	4-Cl-Phenyl	H
19r	I	4-Cl-Phenyl	H
20a	Br	H	CH_3
20b	Br	H	Benzyl
20c	Cl	H	CH_3
20d	Cl	H	Benzyl
20e	Br	Phenyl	CH_3
20f	I	Phenyl	CH_3

Da es unter den von YANG *et al.* beschriebenen Reaktionsbedingungen (80 °C, 12 h) zu keiner Umsetzung der Edukte kam, mussten deutlich drastischere Bedingungen angewandt werden. So wurde die Lewis-Säure Bortrifluoriddiethyletherat nicht in katalytischen Mengen, sondern im Überschuss eingesetzt. Außerdem wurde auf 100 °C erhitzt und die Reaktionsdauer betrug mindestens 18 Stunden. Allerdings waren auch unter diesen Reaktionsbedingungen die Ausbeuten nur gering bis mäßig (13–71 %) im Vergleich zu den von YANG *et al.* erzeugten Ausbeuten (58–98 %).¹¹⁹ Die nach dieser Methode synthetisierten Nitrile **19** und **20** sind in Tabelle 3-4 aufgeführt.

Einführung der Nitrilgruppe mit dem Reagenz Chlorsulfonylisocyanat (Methode C)

Die Indole **29l–m** und **29o**, die einen aliphatischen Isopropyl- bzw. Cyclopropylrest oder einen Pyridin-3-ylrest an Position 2 tragen, konnten nicht nach der Methode B mit NCTS zu den gewünschten Indol-3-carbonitrilen umgesetzt werden. Daher wurde eine dritte Methode zur Einführung der Nitrilgruppe entwickelt. Dazu wurden die Indole mit dem Reagenz Chlorsulfonylisocyanat (**38**) nach einer Methode von MEHTA *et al.* umgesetzt.¹²¹ Das entsprechende Indol **29** wurde zusammen mit Chlorsulfonylisocyanat (**38**) zunächst 4 h bei Raumtemperatur in getrocknetem Acetonitril (ACN) gerührt und anschließend nach Zugabe von Dimethylformamid (DMF) weitere 2 h gerührt (Schema 3-12).

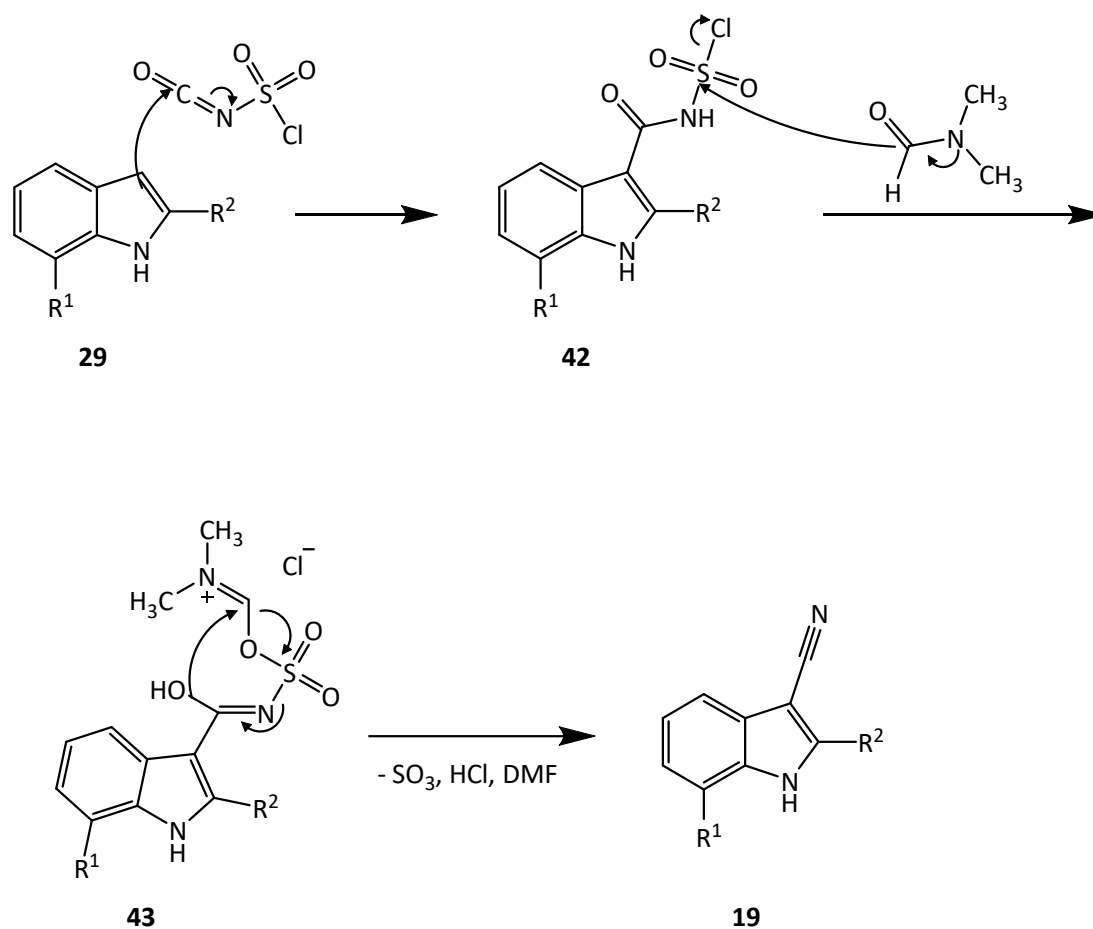


Schema 3-12: Einführung der Nitrilgruppe nach Methode C mit Chlorsulfonylisocyanat (**38**).

a) 1. ACN, 0 °C → RT, 4 h, 2. DMF, ACN, RT, 2 h, 12–54%.

Dabei wird zunächst in einer elektrophilen Substitutionsreaktion das *N*-Chlorsulfonyl-1*H*-indol-3-carbonsäureamid **42** gebildet, das durch die Zugabe von Dimethylformamid zum Nitril reagiert. Die Nitrilsynthese mit Chlorsulfonylisocyanat wurde bereits 1967 von LOHAUS beschrieben, der auch einen möglichen Mechanismus zur Bildung des Nitrils aus dem *N*-Chlorsulfonylcarbonsäureamid **42** veröffentlichte.¹²² Dabei greift das Carbonylsauerstoffatom des DMF am Schwefelatom unter Chloridabspaltung an. Gleichzeitig bildet sich die tau-

tomere Iminolform des *N*-Chlorsulfonylamids **42**, sodass die Zwischenstufe **43** entsteht. Aus dieser bildet sich durch die ringförmige Verschiebung der beteiligten Elektronenpaare und unter Abspaltung von HCl, DMF und Schwefeltrioxid das gewünschte Indol-3-carbonitril **19** (Schema 3-13).¹²²



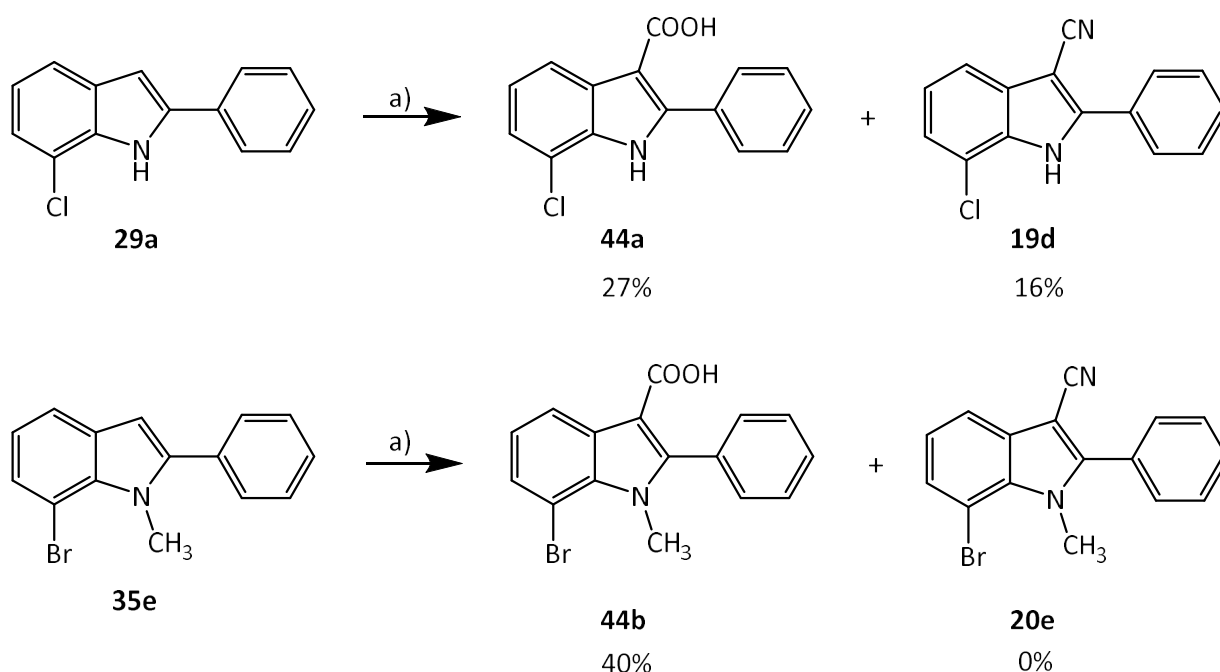
Schema 3-13: Von LOHAUS entwickelter Mechanismus der Nitrilbildung aus *N*-Chlorsulfonylcarbonsäureamiden.¹²²

Die nach dieser Methode dargestellten Indol-3-carbonitrile **19** sind in Tabelle 3-5 aufgeführt. Die Ausbeuten der Indole **19** waren auch nach dieser Methode bis auf die Verbindung **19t** nur mäßig (12-31 %).

Tabelle 3-5: Struktur der nach Methode C synthetisierten Indol-3-carbonitrile **19**.

	R ¹	R ²	Ausbeute
19j	I	Isopropyl	31%
19k	I	Cyclopropyl	12%
19s	I	Pyridin-3-yl	21%
19t	H	Phenyl	54%

Zum Vergleich der Methoden B und C wurde die Verbindung **19t** sowohl nach der Methode B als auch nach der Methode C dargestellt. Ein Vergleich der Ausbeuten zeigte, dass für diese Verbindung mit der Methode C eine deutlich bessere Ausbeute erreicht werden konnte (54 % im Vergleich zu 18 %). Da diese Methode erst im Verlauf der Arbeit entwickelt wurde, würde sie möglicherweise auch für die nach Methode B synthetisierten Indol-3-carbonitrile zu besseren Ausbeuten führen und könnte als Standardmethode zur Einführung der Nitrilgruppe etabliert werden. Bei der Reaktion ist allerdings auf völlige Wasserfreiheit zu achten. Laut LOHAUS verläuft die Bildung des Nitrils aus den *N*-Chlorsulfonylcarbonsäureamiden mit DMF so schnell, dass für diesen Schritt sogar Wasser als Lösemittel verwendet werden könne. In Versuchen zur Darstellung des 7-Chlor-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitrils (**19d**) und der *N*-methylierten Verbindung 7-Brom-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (**20e**) mittels dieser Methode C entstanden aber in größerem Anteil oder ausschließlich die entsprechenden Indol-3-carbonsäuren **44a** und **44b**. Vermutlich ist die Bildung dieser Carbonsäuren auf das Vorhandensein von Restwasser im Lösemittel Acetonitril oder das Eindringen von Feuchtigkeit während der Reaktion zurückzuführen, da durch den nukleophilen Angriff von Wasser am Carbonylkohlenstoffatom des *N*-Chlorsulfonylamids **42** die Bildung von Carbonsäuren möglich ist (Schema 3-14).



Schema 3-14: Unerwünschte Bildung der Indol-3-carbonsäuren **44** bei der Umsetzung der Indole **29a** und **35e** mit Chlorsulfonylisocyanat. Bei der Reaktion von **35e** entstand ausschließlich die Carbonsäure **44b**. a) 1. ACN, 0 °C → RT, 4 h; 2. DMF, ACN, RT, 2 h.

Die Struktur der Carbonsäuren wurde sowohl durch die Ermittlung der elementaren Zusammensetzung als auch durch die Bestimmung der Masse, FT-IR- und NMR-Spektrometrie bestätigt. Im ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **44a** sind im tiefen Feld bei etwa 12 ppm zwei Singulets zu sehen, die den Protonen am Indolstickstoffatom und an der Säurefunktion zugeordnet werden können (Abbildung 3-1). Im Spektrum der Verbindung **19d** dagegen taucht in diesem Bereich nur das Signal der NH-Gruppe auf (nicht abgebildet).

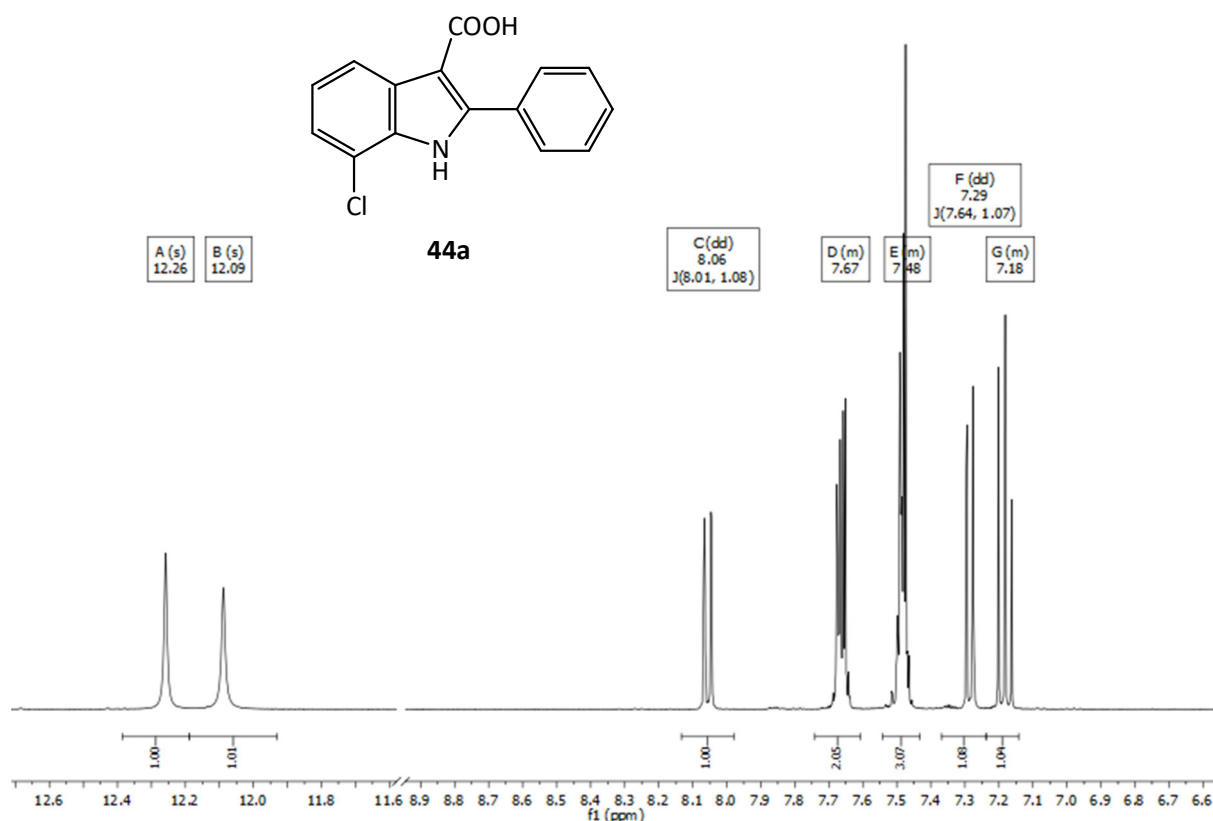


Abbildung 3-1: ¹H-NMR-Spektrum der Carbonsäure **44a**. Die zwei Signale im tiefen Feld werden durch die NH- und COOH-Gruppe verursacht. Die anderen Signale bei etwa 7–8 ppm können den aromatischen Protonen zugeordnet werden

Auch das ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **44a** bestätigt die Struktur der Carbonsäure, denn dort taucht ein Signal im tiefen Feld bei etwa 166 ppm auf, das dem Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe zugeordnet werden kann. Dieses Signal ist im Spektrum der Verbindung **19d** nicht vorhanden. Dort wird aber ein für die Nitrilverbindungen **19** und **20** charakteristisches Signal bei 83 ppm beobachtet, das durch das C3-Atom des Indols hervorgerufen wird (Abbildung 3-2).

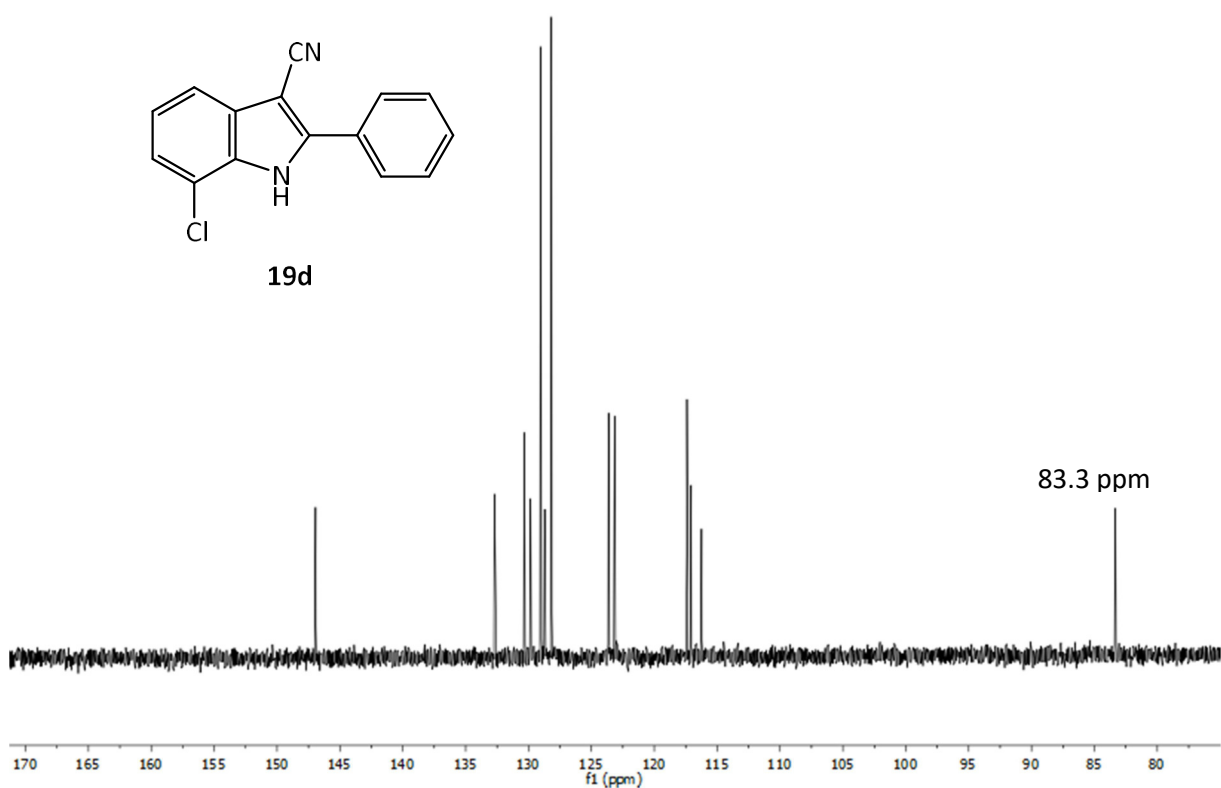
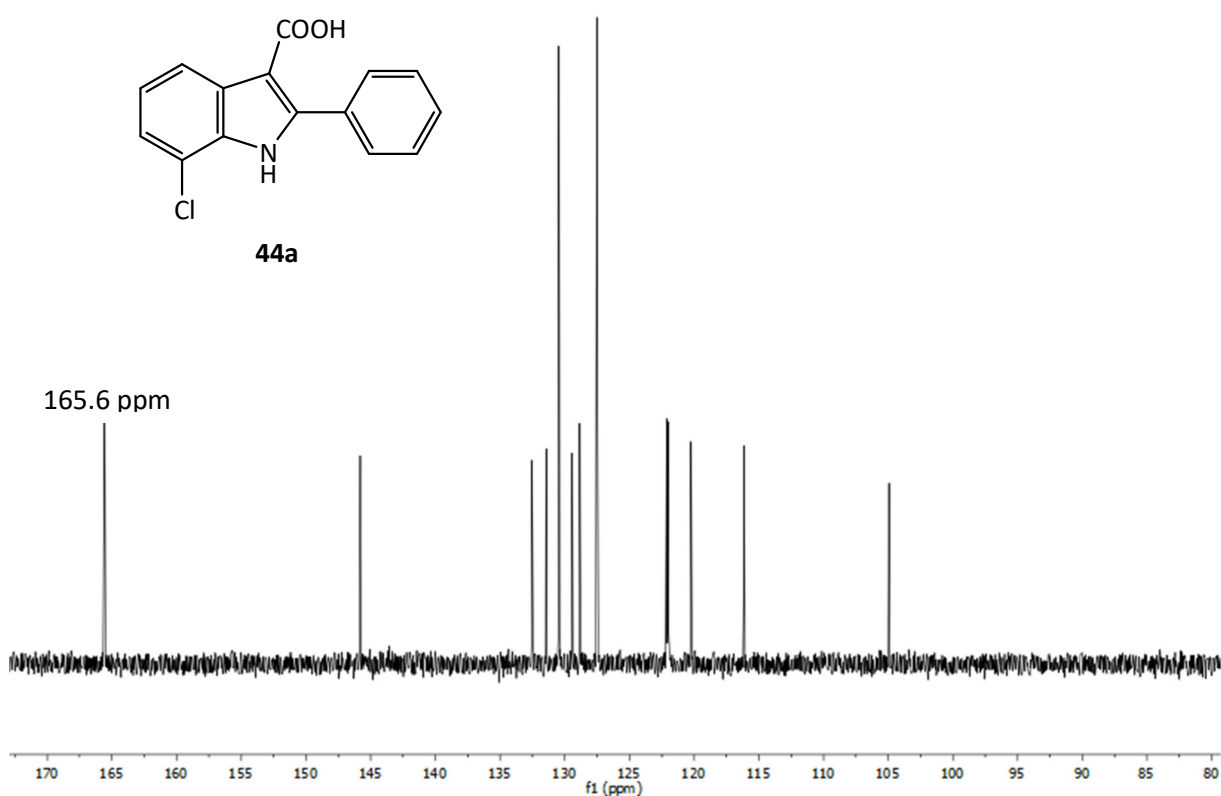


Abbildung 3-2: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren der Säure **44a** und des Nitrils **19d**. Das Spektrum der Carbonsäure zeigt ein Signal im tiefen Feld bei 166 ppm, das durch das Carboxylkohlenstoffatom verursacht wird. Dagegen taucht im Spektrum der Verbindung **19d** ein für die Indol-3-carbonitrile charakteristisches Signal bei 83 ppm auf, das dem C3-Atom des Indols zugeordnet werden kann.

Das FT-IR-Spektrum des Nitrils **19d** zeigt bei 2200 cm^{-1} die für Nitrile charakteristische Bande der Valenzschwingung der $\text{C}\equiv\text{N}$ -Bindung, die in den IR-Spektren aller Indole **19** und **20** beobachtet wurde. Dagegen fehlt diese typische Bande im IR-Spektrum der Verbindung **44a**, was die Anwesenheit einer Nitrilgruppe ausschließt. Die Verbindung **44a** zeigt im Bereich zwischen 3300 und 2600 cm^{-1} ein breites Signal, das durch die OH-Valenzschwingung hervorgerufen wird. Zusätzlich kann das Signal der $\text{C}=\text{O}$ -Valenzschwingung bei 1649 cm^{-1} beobachtet werden (Abbildung 3-3).

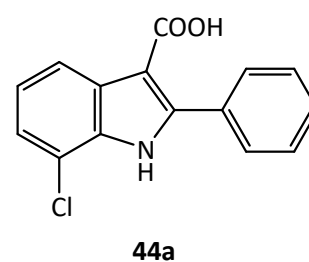
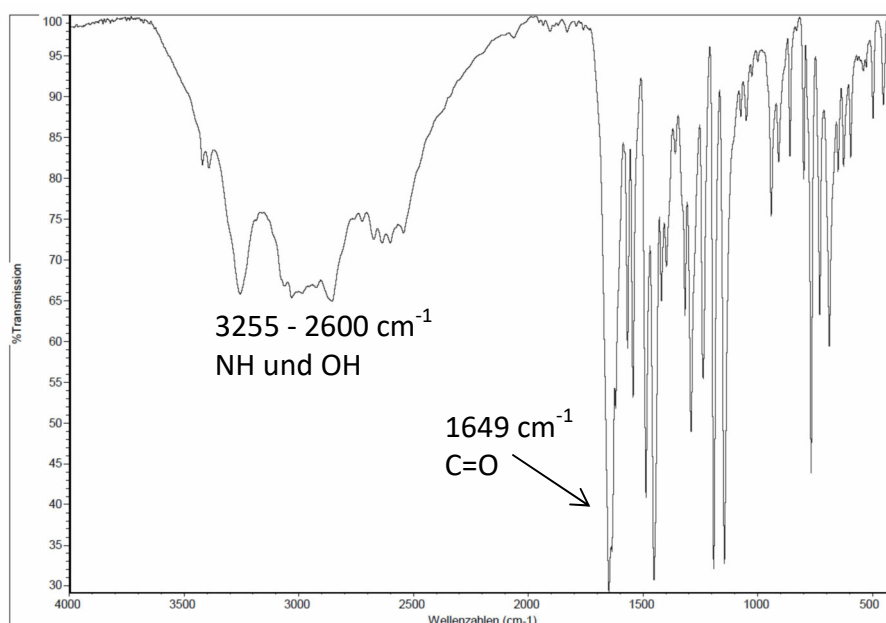
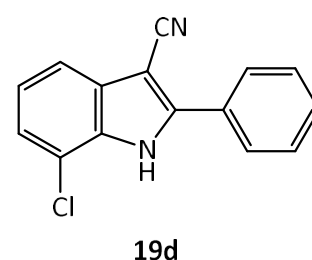
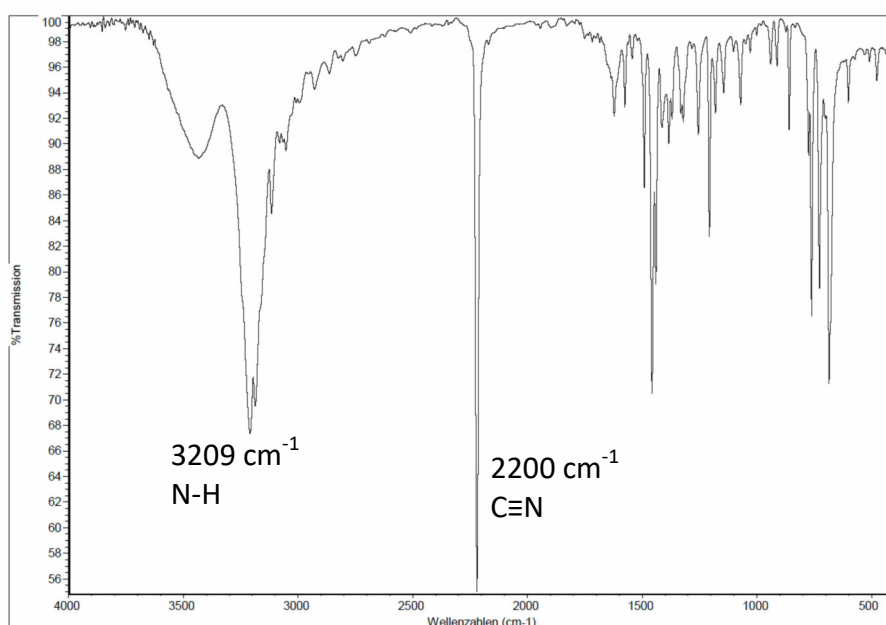
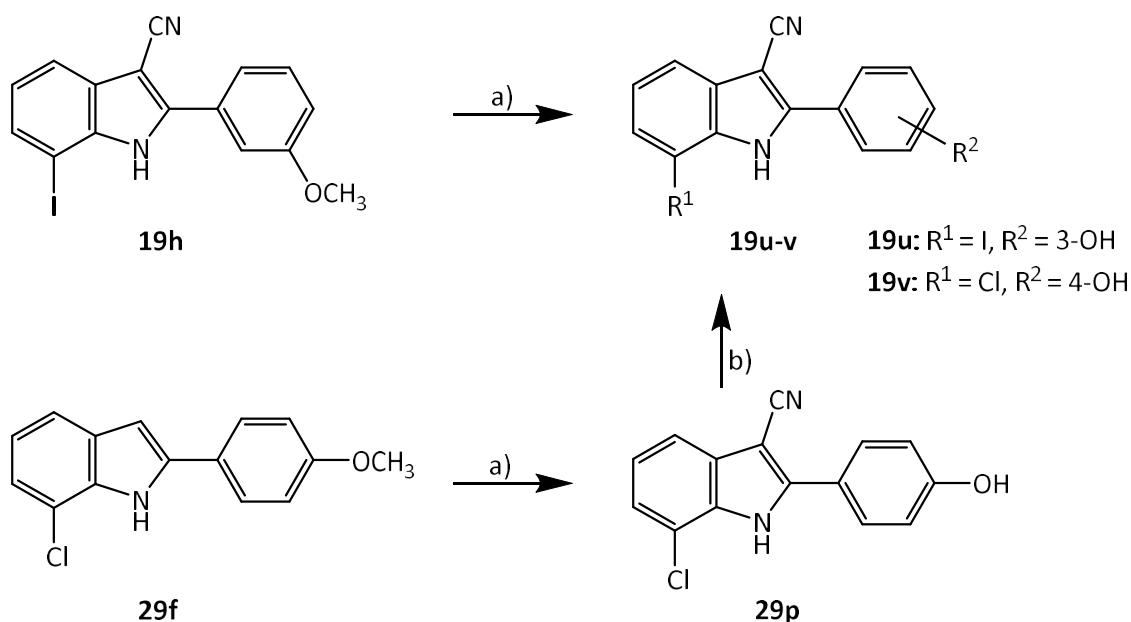


Abbildung 3-3: FT-IR-Spektren der Verbindungen **19d** und **44a**. Die charakteristischen Banden der Verbindungen sind im Spektrum gekennzeichnet.

3.3.2 Synthese von polaren Derivaten der 7-Halogenindol-3-carbonitrile

In Hinblick auf die Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften der Testverbindungen sollten in die Reste an Position 2 des Indols polare Gruppen eingeführt werden. Dazu wurden das bereits in den *docking*-Studien untersuchte Diol **21** sowie die Phenole **19u** und **19v** synthetisiert.

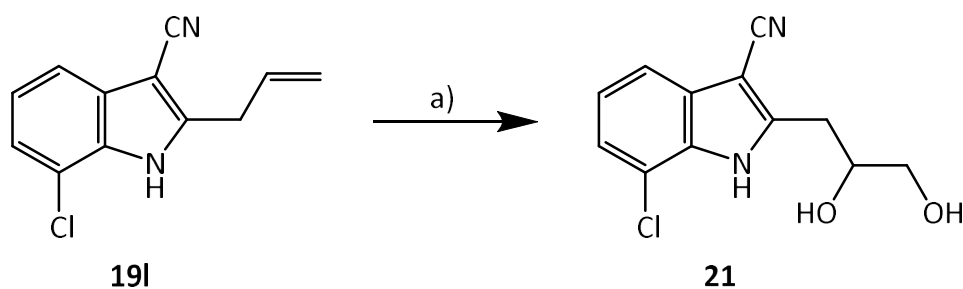
Zur Darstellung des 2-(3-Hydroxyphenyl)-7-iod-1*H*-indol-3-carbonitrils (**19u**) wurde die Verbindung **19h** demethyliert. Die Etherspaltung erfolgte durch einen fünffachen Überschuss an Bortribromid in getrocknetem Dichlormethan über 24 Stunden (Schema 3-15).¹²³ Das gleiche Vorgehen war zur Synthese der Verbindung **19v** ausgehend von **19g** nicht möglich, da sich dieses nicht im Lösemittel Dichlormethan und auch in keinem anderen geeigneten Lösemittel löste. Daher wurde zunächst das Indol **29f** mit der beschriebenen Methode demethyliert und anschließend mit NCTS (**37**) zum gewünschten 7-Chlor-2-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-indol-3-carbonitril (**19v**) umgesetzt. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen konnte allerdings auch diese Reaktion nicht unter den Standardbedingungen in 1,2-Dichlorethan erfolgen. Daher wurde Toluol als Lösemittel verwendet, auf 130 °C erhitzt und ein großer Überschuss an Bortrifluoriddiethyletherat eingesetzt (Schema 3-15).



Schema 3-15: Synthese der Phenole **19u–v** ausgehend von **19h** bzw. **29f**. a) BBr₃, Dichlormethan, 0 °C → RT, 12–24 h, 22–47%; b) NCTS, BF₃•OEt₂, Toluol, Ölbadtemperatur: 130 °C, 2 h, 3%.

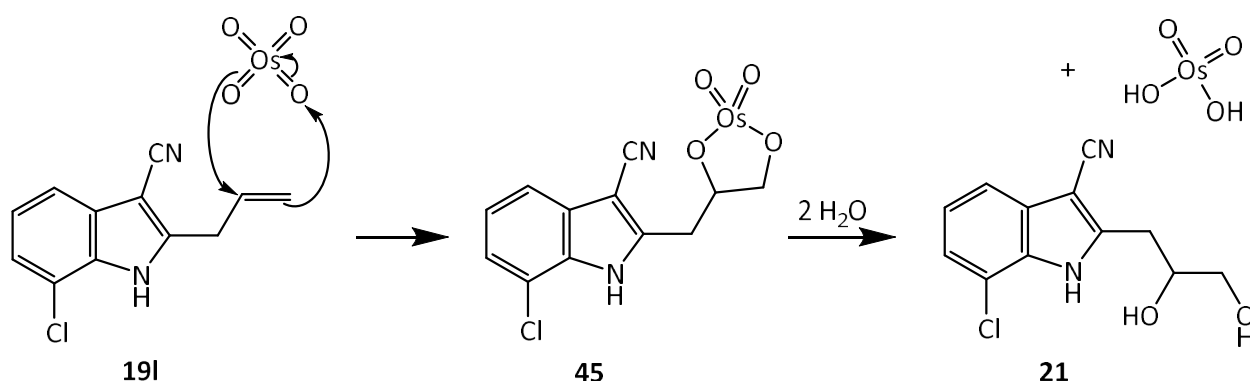
Das Diol **21** wurde durch Oxidation der Allylseitenkette von **19l** im Rahmen einer Upjohn-Dihydroxylierung synthetisiert. Dazu wurde die Verbindung **19l** in einem Aceton/Wasser-

Gemisch gelöst und nach Zugabe von Osmiumtetroxid und *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.¹²⁴ Nach anschließender Aufarbeitung und Extraktion mit Ethylacetat konnte das gewünschte 7-Chlor-2-(2,3-dihydroxypropyl)-1*H*-indol-3-carbonitril (**21**) in guter Ausbeute (88 %) isoliert werden (Schema 3-16).



Schema 3-16: Darstellung des Diols **21** durch *cis*-Dihydroxylierung der Allylseitenkette der Verbindung **19I**. a) OsO₄, NMO, Aceton/Wasser, RT, 72 h, 88%.

Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine *cis*-Dihydroxylierung, bei der sich zunächst durch eine 1,3-Cycloaddition von Osmiumtetroxid an die Doppelbindung die cyclische Zwischenstufe **45** bildet, die einen Diester der Osmium(VI)säure darstellt. Durch Hydrolyse dieses Ester entstehen das gewünschte Diol **21** und Osmium(VI)säure. Da Osmiumtetroxid sehr teuer ist, wird es nur in katalytischen Mengen verwendet. Daher wird *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid in stöchiometrischen Mengen zugesetzt, um die entstandene Osmium(VI)säure zu Osmiumtetroxid zu oxidieren und damit eine erneute Reaktion der Doppelbindung eines Eduktmoleküls mit OsO₄ zu ermöglichen (Schema 3-17).¹²⁵



Schema 3-17: Mechanismus der Dihydroxylierung der Allylseitenkette von **19I** durch Osmiumtetroxid über die cyclische Zwischenstufe **45**.

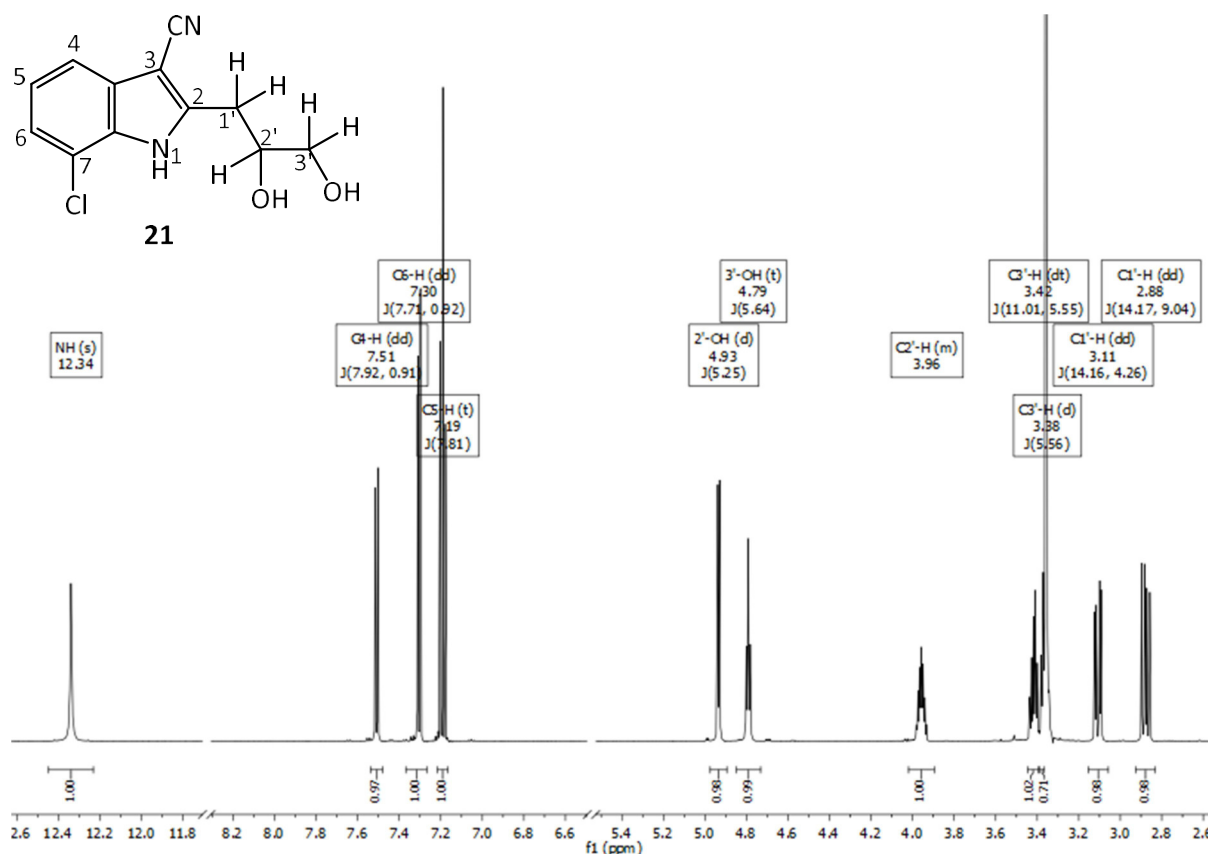


Abbildung 3-5: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **21**. Das Signal von HDO überdeckt einen Teil des Signals eines Protons an C3' bei 3.38 ppm.

Die CH_2 -Gruppen bilden mit dem mittleren C2'-Proton der Seitenkette jeweils ein ABX-System. Die Dubletts von Dubletts bei 2.88 und 3.11 ppm werden den C1'-Protonen zugeordnet. Diese koppeln untereinander mit einer großen Kopplungskonstanten von 14.2 Hz und stellen ein AB-System dar. Durch die zusätzliche Kopplung mit dem C2'-Proton, mit dem die Protonen mit unterschiedlicher Kopplungskonstante koppeln und dessen Signal bei 3.96 ppm deutlich weiter im tiefen Feld erscheint, ergibt sich das ABX-System. Für die Protonen an C3' ist das Kopplungsmuster noch etwas komplexer. Da sie sowohl untereinander als auch mit dem benachbarten OH- und C2'-Proton koppeln, erscheinen sie als Dublett von Triplets. Im ^1H -Spektrum wird allerdings ein Teil des Signals eines Protons vom HDO-Signal überlagert. Das Proton an C2' kann als X-Teil der beiden Systeme betrachtet werden und verursacht das Multiplett bei 3.96 ppm (Abbildung 3-5).

Nach einem H/D-Tausch erscheinen beide Signale der C3'-Protonen, da sich das Signal des HDO verschoben hat (Abbildung 3-6). Durch die Zugabe von D_2O werden die OH-Protonen durch Deuterium ersetzt, sodass die Signale weitgehend aus dem ^1H -NMR-Spektrum gelöscht werden. Da nun auch keine Kopplung zu den OH-Protonen erfolgt, erscheinen die C3'-

Protonen jeweils als Dubletts von Dubletts bei 3.37 und 3.42 ppm. Das C2'-H koppelt nur noch mit den beiden benachbarten CH₂-Gruppen und erscheint daher als Dublett von Triplets von Dubletts. Nach dem H/D-Tausch ist der sogenannte Dacheffekt, der charakteristisch für AB-Systeme ist, für die beiden CH₂-Gruppen jeweils deutlich erkennbar.

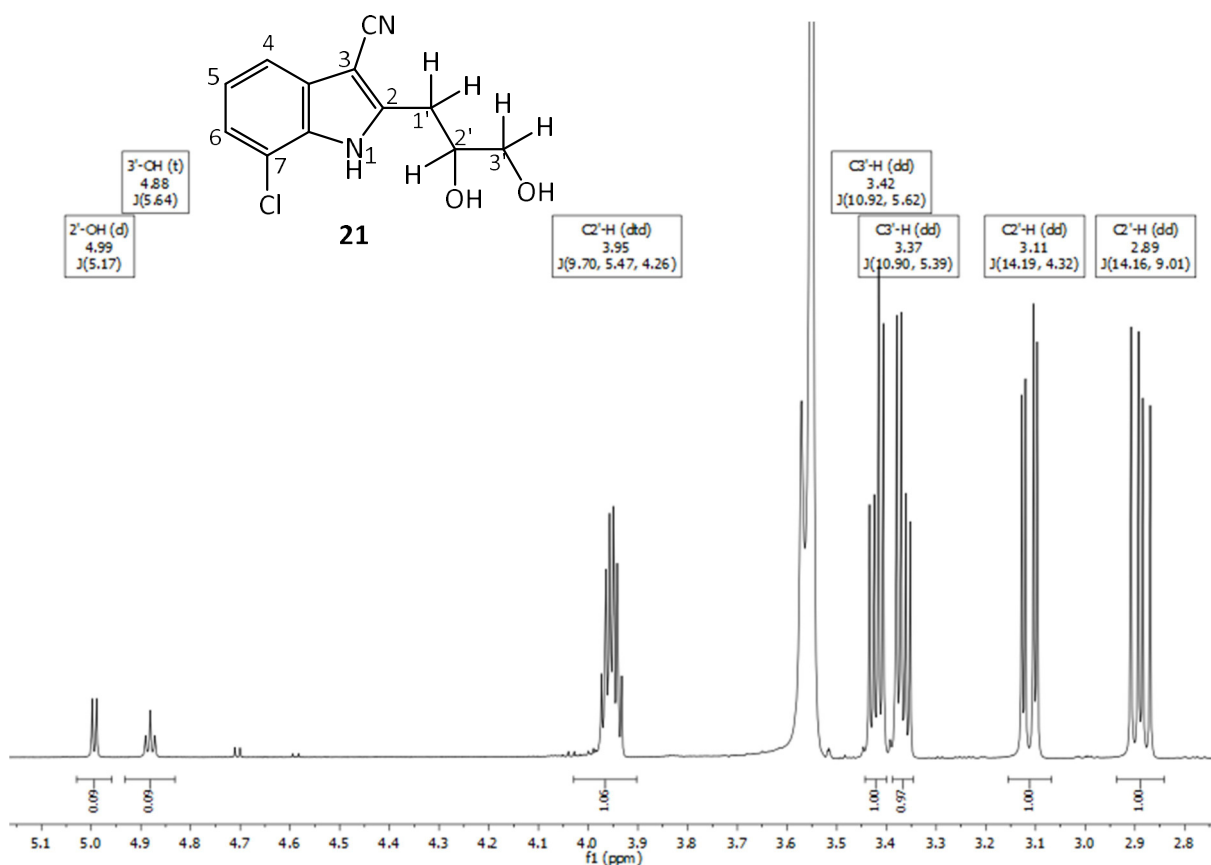


Abbildung 3-6: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **21** nach Durchführung des H/D-Tausches. Da das Signal von HDO etwas ins tiefe Feld verschoben ist, sind beide Signale der C3'-Protonen vollständig sichtbar.

4 Biologische Aktivität

Die synthetisierten Indol-3-carbonitrile **19** und **20** wurden auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber DYRK1A und verwandten Kinasen der CMGC-Gruppe untersucht. Diese Aktivität wurde mit einem radiometrischen Enzymassay von Manros Therapeutics (Roscoff, Frankreich) unter der Leitung von Prof. Laurent Meijer bestimmt.

Die DYRK1A-inhibitorische Aktivität ausgewählter Verbindungen wurde außerdem in zellulären Assays untersucht. Diese Bestimmungen wurden unter der Leitung von Prof. Walter Becker am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der RWTH Aachen durchgeführt.

4.1 Kinaseinhibitorische Aktivität

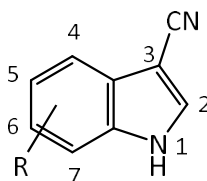
Die Verbindungen wurden an den Kinasen der DYRK- und CLK-Familie sowie an GSK-3 getestet. Zunächst wurde die Restaktivität der Kinasen nach Inkubation mit einer 10 μ M Lösung der jeweiligen Testverbindung bestimmt. Zeigten die Verbindungen bei dieser Konzentration eine deutliche inhibitorische Wirkung, wurde der IC_{50} -Wert ermittelt. Dazu wurden die Verbindungen mit Lösungen verschiedener Inhibitorkonzentrationen inkubiert und die Restaktivität der Kinasen gemessen. Anschließend wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, aus der der IC_{50} -Wert abgelesen werden konnte. Lag der IC_{50} -Wert über 10 μ M, wurden die Verbindungen als inaktiv an dieser Kinase eingestuft.

Variationen am Sechsring des Indols

Die Ausgangsverbindung **19a**, die als Grundlage dieser Arbeit diente und bereits von FALKE synthetisiert wurde, ist im mikromolaren Konzentrationsbereich ein schwacher Inhibitor von DYRK1A. Auch CLK1 wird mit vergleichbarer Aktivität gehemmt, allerdings keine weiteren Kinasen der CMGC-Gruppe (Tabelle 4-1). Wie auch bereits bei den von FALKE untersuchten 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren stieg die inhibitorische Aktivität an DYRK1A durch den Austausch des 7-Chlorsubstituenten gegen Brom und Iod an. Der Austausch von Chlor gegen Iod führte zu einem achtfachen Anstieg der Hemmaktivität. Dies bestätigt die bereits in den *docking*-Studien untersuchte Vermutung, dass eine Halogenbindung in die Protein-Ligand-Interaktion involviert ist. Aufgrund der geometrischen Anordnung ist es sehr wahrscheinlich, dass es zur Ausbildung einer Halogenbindung zu einem Wassermolekül kommt, das über eine Wasserstoffbrückenbindung mit Leu242 (*gk*+3) der *hinge*-Region interagiert.

Mit dem Anstieg der Aktivität an DYRK1A stieg aber gleichzeitig auch die Hemmung der anderen untersuchten Kinasen. Die 7-Iodverbindung **19c** hemmte auch DYRK1B, CLK1 und CLK4 im niedrig mikromolaren Bereich und zeigte somit nur geringe Selektivität für DYRK1A.

Tabelle 4-1: IC₅₀-Werte (μM) der an Position 1 und 2 unsubstituierten Indol-3-carbonitrile **19a–c** und **19n**.



19

	R	DYRK1A	DYRK1B	DYRK2	DYRK3	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	GSK-3
19a	7-Cl	3.3	>10	>10	>10	3.33	>10	>10	>10	>10
19b	7-Br	1.1	5.9	>10	>10	2.9	>10	>10	4	>10
19c	7-I	0.410	1.8	8	>10	1.9	8	>10	1.8	>10
19n	5-I	1.3	2	10	>10	10	-	-	>10	0.53

- Die Verbindung zeigte bei einer Konzentration von 10 μM eine Inhibition < 20 %, sodass kein IC₅₀-Wert bestimmt wurde.

Die Einführung eines Iodsubstituenten an Position 5 des Indolsechsrings führte zu einer verminderten Aktivität an DYRK1A und an allen DYRKs und CLKs. Diese Verbindung erwies sich allerdings als ein submikromolarer Inhibitor von GSK-3, an der die 7-Halogenverbindungen **19a–c** keine Aktivität zeigten. Die Ergebnisse von *docking*-Untersuchungen dieser Verbindung zeigen, dass es in der Bindetasche von DYRK1A zu einer Kollision mit der Oberfläche des Proteins kommt. Da in GSK-3 ein anderer Bindemodus vorhergesagt wurde, füllt die Struktur dort die ATP-Bindestelle gut aus. Bei dieser Orientierung würde ein Substituent in Position 7 zu einem *clash* führen, was möglicherweise die Aktivitätsunterschiede erklärt (Abbildung 4-1).

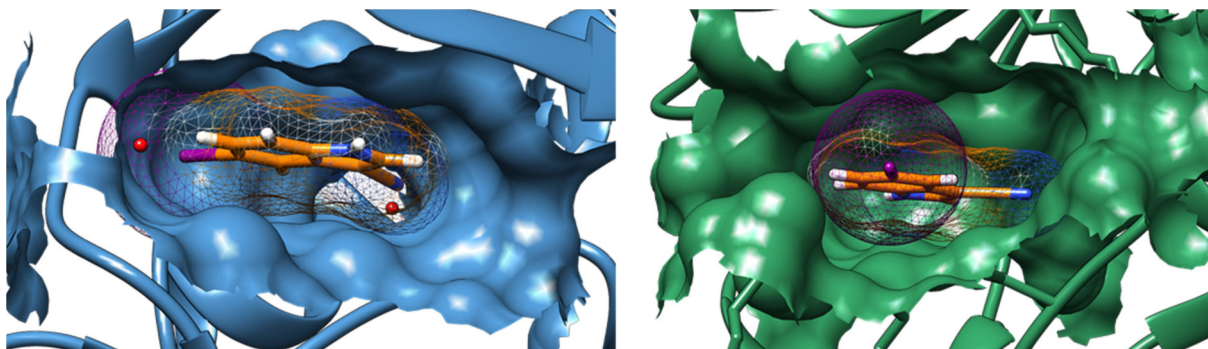


Abbildung 4-1: Möglicher Bindemodus der Verbindung **19n** (orange) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (blau, PDB: 4YLJ) und GSK-3 β (grün, PDB: 5OY4¹²⁶). In der Bindestelle von DYRK1A kommt es zu einer Kollision des Iodsubstituenten mit der Proteinoberfläche. Da die Verbindung in der Tasche von GSK-3 β eine andere Orientierung einnimmt, wird ein *clash* verhindert.

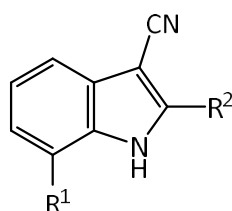
Substitution der Position 2 der Indol-3-carbonitrile

Die Einführung eines Phenylsubstituenten an Position 2 der Indol-3-carbonitrile führte zu einem 40–80-fachen Anstieg der kinaseinhibitorischen Aktivität im Vergleich zu den unsubstituierten Verbindungen **19a–c** (Tabelle 4-2). Die 7-halogenierten Verbindungen **19d–f** sind nanomolare Inhibitoren von DYRK1A (IC_{50} = 10–40 nM) und die potentesten Strukturen dieser Arbeit. Sie zeigten analog zu den unsubstituierten Verbindungen einen Aktivitätsanstieg von Chlor über Brom zu Iod. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den *docking*-Studien, da ein Phenylsubstituent zusätzliche aromatische Wechselwirkungen ermöglichte und gleichzeitig die Stärke der Halogenbindung durch einen kleineren Abstand zum Wasser und durch einen optimierten σ -hole-Winkel erhöhte (Abbildung 2-15). Die Bedeutung des 7-Halogensubstituenten für die DYRK1A-Aktivität wird auch durch den Vergleich mit der in Position 7 methylierten Verbindung **19o** und der in Position 7 unsubstituierten Verbindung **19t** deutlich. Das Entfernen des Iodsubstituenten führt zu einer 40-fach geringeren Aktivität und auch die 7-methylierte Verbindung **19o** zeigt nur eine schwache Inhibition von DYRK1A (Restaktivität von 35 % bei 10 μ M). Somit scheinen eher spezifische Halogenbindungen für die Aktivität verantwortlich zu sein als unspezifische hydrophobe Interaktionen der Halogensubstituenten, da für diese auch die 7-Methylgruppe zur Verfügung stehen würde.

Der Substituent an Position 7 hat auch Einfluss auf die Selektivität der Verbindungen. Während die 7-Chlorverbindung nur CLK1 und CLK4 als einzige *off-targets* hemmte, zeigten die 7-Brom- und 7-Iodverbindung zusätzlich auch Aktivität an DYRK1B und CLK2. Der 7-Iodsubstituent führte aber mit einer fünf- bis achtfachen Selektivität gegenüber CLK1 und

CLK4 zu der höchsten Selektivität der 2-Phenylverbindungen. Obwohl die Struktur der ATP-Bindetasche von DYRK1B eine sehr große Übereinstimmung mit der Bindetasche von DYRK1A zeigt und sich die Aminosäuresequenz nur an einer Position unterscheidet, scheint eine selektive Hemmung von DYRK1A möglich zu sein. Die Verbindung **19d** führte zu keiner Inhibition von DYRK1B und auch die Verbindung **19f** zeigte eine 57-fache Selektivität für DYRK1A. Dagegen zeigte die 7-Bromverbindung **19e** nur eine etwa fünffache höhere Aktivität an DYRK1A als an DYRK1B.

Tabelle 4-2: Kinaseinhibitorische Aktivität^a der Indol-3-carbonitrile **19** mit einem Phenylsubstituenten in Position 2.



19

	R ¹	R ²	DYRK 1A	DYRK 1B	DYRK 2	DYRK 3	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	GSK-3
19d	Cl	Phenyl	0.040	>10	>10	>10	0.070	>10	>10	0.120	>10
19e	Br	Phenyl	0.025	0.120	>10	>10	0.067	0.433	>10	0.033	-
19f	I	Phenyl	0.010	0.570	>10	>10	0.080	2	>10	0.050	>10
19o	CH ₃	Phenyl	35%	74%	75%	-	56%	75%	-	43%	-
19t	H	Phenyl	0.4	6	-	-	0.800	>10	-	2	-

- ^a Die Aktivität ist als IC₅₀-Wert (μM) oder als Restaktivität (%) der Kinase im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach Inkubation mit einer 10 μM Lösung angegeben.
- Die Verbindungen zeigten bei einer Konzentration von 10 μM eine Inhibition < 20 %, sodass kein IC₅₀-Wert bestimmt wurde.

Die Einführung weiterer Reste am 2-Phenylring führte in allen Fällen zu einem Rückgang der Aktivität (Tabelle 4-3). Bei den 7-Chlorverbindungen **19q** und **19p** führte sowohl ein Chlor- als auch ein Methoxysubstituent in *para*-Position des 2-Phenylrings zu einem Verlust der Aktivität. Entgegen der Ergebnisse der *docking*-Untersuchungen (Abbildung 4-2) scheint der zusätzliche Substituent eine optimale Ausrichtung des Inhibitors in der ATP-Bindetasche zu verhindern. In den vorhergesagten Bindemodi sind der Chlor- bzw. Methoxysubstituent seit-

lich in Richtung der zum Lösemittel geöffneten Seite der Bindetasche positioniert und finden somit ungehindert Platz in der Bindestelle.

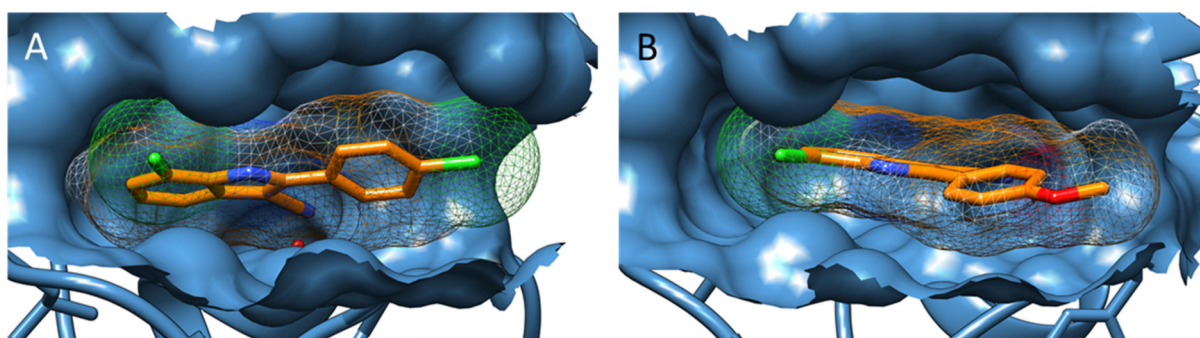
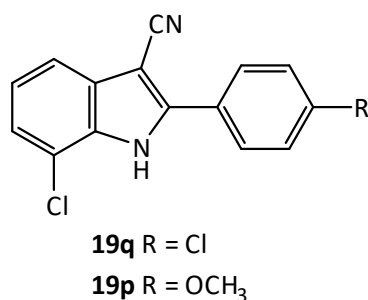


Abbildung 4-2: Mögliche Orientierung der Verbindungen **19q** (A) und **19p** (B) in der Bindetasche von DYRK1A (blau, PDB: 4YLJ¹⁰²). Die *para*-Substituenten am Phenylring sind seitlich positioniert und ragen in Richtung der Lösemittel zugewandten Seite aus der Bindetasche heraus.

Auch Verbindung **19v** trägt wie **19q** und **19p** einen Substituenten in *para*-Position des Phenylrings. Allerdings ist diese Verbindung ein submikromolarer Inhibitor von DYRK1A (IC₅₀ = 0.1 µM). Die durch die Etherspaltung erzeugte OH-Funktion weist ein kleineres Volumen als ein Chlorsubstituent oder eine Methoxygruppe auf und scheint damit besser Platz in der Bindetasche zu finden. In *docking*-Studien zeigte sich außerdem, dass die OH-Gruppe eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zum *backbone*-Carbonylsauerstoffatom des Lys167 der Glycin-reichen Schleife des Rezeptors ermöglicht. Diese zusätzliche Interaktion erhöht möglicherweise die Bindungsaffinität und erklärt somit den beobachteten Aktivitätsanstieg im Vergleich zu den Verbindungen **19q** und **19p** (Abbildung 4-3).

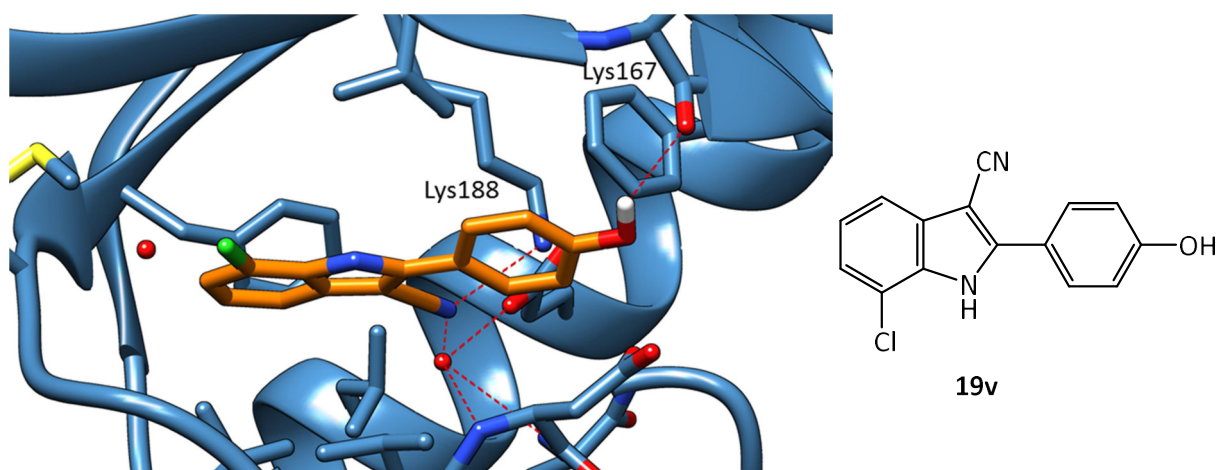
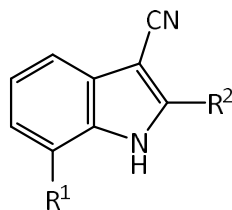


Abbildung 4-3: Vorhergesagter Bindemodus des 2-(4-Hydroxyphenyl)-Derivats **19v** (orange) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (blau). Die OH-Gruppe ermöglicht eine weitere Wasserstoffbrücke zu Lys167 des Proteins.

Auch bei den 7-Iodverbindungen **19g–h** und **19r** führten die zusätzlichen Substituenten am Phenylring zu Einbußen der kinaseinhibitorischen Aktivität. Während auch hier der *para*-Chlorsubstituent (**19r**) zu einem starken Abfall der Inhibition führte, wurden die Methoxy-substituenten besser toleriert. Obwohl sich **19g** und **19h** als submikromolare Inhibitoren von DYRK1A herausstellten, zeigten auch die Methoxyverbindungen eine über 20-fach geringere Aktivität an DYRK1A im Vergleich zu Verbindung **19f** mit einem unsubstituierten Phenylring in Position 2. Es konnte kein Aktivitätsunterschied zwischen der *para*-substituierten Verbindung **19g** und der *meta*-substituierten Verbindung **19h** beobachtet werden. Allerdings zeigte sich ein Unterschied in der Selektivität der Verbindungen. Während das 2-(3-Methoxyphenyl)-Derivat **19h** auch die verwandten Kinasen DYRK1B, CLK1 und CLK4 mit submikromolarer Aktivität hemmte, zeigte die 4-Methoxyverbindung **19g** keine Aktivität an DYRK1B und hemmte zusätzlich nur CLK1 und CLK4 im submikromolaren Bereich.

Durch den Austausch des 2-Phenylrings von **19f** gegen einen Pyridin-3-ylring wurde Verbindung **19s** erhalten. Das Ziel war es, die Hydrophilie und damit die Wasserlöslichkeit der Verbindung zu erhöhen und gleichzeitig die inhibitorische Aktivität zu erhalten, da der Pyridinring etwa das gleiche Volumen wie ein Phenylring einnimmt und damit ein vergleichbarer Bindemodus angenommen wurde. Tatsächlich ist **19s** ein potenter DYRK1A-Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert im zweistellig nanomolaren Bereich ($IC_{50} = 80 \text{ nM}$), im Vergleich zu **19f** zeigte **19s** trotzdem eine 8-fach geringere Aktivität. Allerdings wurde die Inhibition von CLK4 aufgehoben und **19s** wies die verwandte DYRK1B und CLK1 als einzige *off-targets* auf.

Tabelle 4-3: Kinaseinhibitorische Aktivität der Indol-3-carbonitrile **19** mit substituierten Phenylresten in Position 2 des Indols.^a**19**

	R ¹	R ²	DYRK 1A	DYRK 1B	DYRK 2	DYRK 3	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	GSK-3
19q	Cl	4-Cl-Phenyl	60%	n.b.	n.b.	n.b.	68%	n.b.	n.b.	n.b.	-
19p	Cl	4-H ₃ CO-Phenyl	60%	n.b.	n.b.	n.b.	47%	n.b.	n.b.	n.b.	-
19v	Cl	4-OH-Phenyl	0.1	0.8	3	-	0.08	0.32	8	0.07	0.3
19r	I	4-Cl-Phenyl	42%	79%	-	-	55%	-	-	36%	-
19g	I	4-H ₃ CO-Phenyl	0.233	>10	>10	>10	0.333	>10	>10	0.220	-
19h	I	3-H ₃ CO-Phenyl	0.210	0.633	>10	>10	0.633	3.3	>10	0.290	-
19s	I	Pyridin-3-yl	0.08	0.3	-	-	0.200	>10	-	>10	-

a Die Aktivität ist als IC₅₀-Wert (μM) oder als Restaktivität (%) der Kinase im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach Inkubation mit einer 10 μM Lösung angegeben.

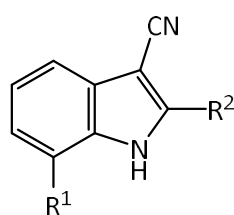
- Die Verbindungen zeigten bei einer Konzentration von 10 μM eine Inhibition < 20 %, sodass kein IC₅₀-Wert bestimmt wurde.

n.b. nicht bestimmt

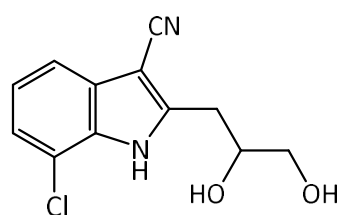
Auch die Verbindungen **19i-m** und **21** mit aliphatischen Resten an Position 2 wurden mit dem Ziel synthetisiert, die Wasserlöslichkeit der Inhibitoren zu verbessern. Dabei wurden insgesamt die unpolaren Reste besser toleriert (Tabelle 4-4). Die Verbindungen **19m** und **21** mit polaren Resten zeigten nur eine schwache Inhibition von DYRK1A mit mikromolaren IC₅₀-Werten, die vergleichbar mit der Ausgangsverbindung **19a** war. Trotz der in den *docking*-Untersuchungen beobachteten zusätzlichen Interaktionsmöglichkeiten der Hydroxylgruppen von **21** (Abbildung 2-19), die eine höhere Bindungsaffinität erwarten ließen, stellte sich **21** als schwacher DYRK1A-Inhibitor heraus. Scheinbar werden aufgrund der lipophilen Amino-

säuren, die die Oberfläche der ATP-Bindetasche bilden, kaum polare Gruppen in den Liganden toleriert. Dies ist auch ein möglicher Grund für die geringe Aktivität von **19m**. Aufgrund der großen Seitenkette an Position 2 spielt hier eventuell auch der limitierte Platz in der Bindetasche eine Rolle, sodass **19m** dort nicht die favorisierte Orientierung einnehmen kann.

Tabelle 4-4: IC₅₀-Werte (μM) der Indol-3-carbonitrile **19** und **21**, die einen aliphatischen Rest an Position 2 des Indols tragen.



19



21

	R ¹	R ²	DYRK1 A	DYRK 1B	DYRK 2	DYRK 3	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	GSK- 3
19l	Cl	Allyl	0.690	1.3	>10	>10	0.533	1.3	>10	0.533	-
19m	Cl		3.9	>10	>10	>10	4.9	>10	>10	4	-
21	-	-	2	4.2	-	-	2	10	-	2	2
19j	I	Isopropyl	0.28	0.53	>10	>10	0.1	0.7	>10	0.1	1.3
19k	I	Cyclopropyl	0.14	0.5	8	>10	0.110	1	-	0.1	-
19i	I	Cyclopentyl	0.07	0.6	-	-	0.12	1	-	0.1	>10

- Die Verbindungen zeigten bei einer Konzentration von 10 μM eine Inhibition < 20 %, sodass kein IC₅₀-Wert bestimmt wurde.

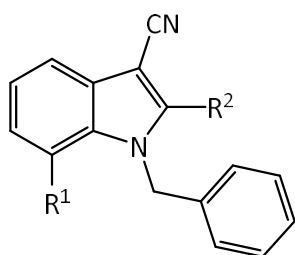
Die Einführung von unpolaren aliphatischen Seitenketten führte in allen Fällen zu submikromolaren Inhibitoren von DYRK1A. Im Vergleich zu den an Position 2 unsubstituierten Verbindungen **19a** und **19c** bewirkten die unpolaren Reste einen deutlichen Aktivitätsanstieg, der vermutlich mit zusätzlichen hydrophoben Interaktionen in der ATP-Bindetasche begründet werden kann. Aufgrund der zunehmenden Interaktionsmöglichkeiten nahm die Potenz der Verbindungen auch mit zunehmender Größe der Gruppen in Position 2 zu. Verbindung **19k** mit einem Cyclopentylrest in Position 2 stellte somit nach den 2-Phenylverbindungen **19d–f** die potenteste Verbindung dieser Arbeit dar (IC₅₀ = 70 nM), die allerdings gleichzeitig auch

DYRK1B, CLK1 und CLK4 hemmte. Da die Phenylreste an Position 2 neben den hydrophoben Wechselwirkungen zusätzlich auch aromatische Interaktionen zur Seitenkette von Phe170 ausbilden können, führen diese zu potenteren Inhibitoren als die Verbindungen **19i** und **19k** mit cyclischen Aliphaten in Position 2.

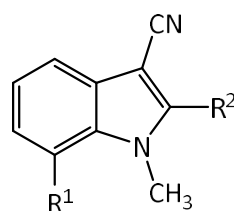
Einführung von Substituenten am Indolstickstoff

Zur Bewertung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden auch Liganden mit Substituenten am Indolstickstoffatom synthetisiert und auf ihre kinaseinhibitorische Aktivität getestet (Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Kinaseinhibitorische Aktivität^a der *N*-substituierten Indol-3-carbonitrile **20**.



20b, 20d



20a, 20c, 20e-f

	R ¹	R ²	DYRK 1A	DYRK 1B	DYRK 2	DYRK 3	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	GSK-3
20b	Br	H	-	n.b.	n.b.	n.b.	53%	n.b.	n.b.	n.b.	-
20d	Cl	H	-	78%	-	-	-	-	-	-	-
20a	Br	H	1.9	>10	>10	>10	3.33	>10	>10	>10	>10
20c	Cl	H	32%	47%	-	-	56%	70%	-	30%	-
20e	Br	Phenyl	2.3	10	-	-	>10	-	-	1	-
20f	I	Phenyl	0.65	2.1	-	-	0.6	>10	-	1	-

a Die Aktivität ist als IC₅₀-Wert (μM) oder als Restaktivität (%) der Kinase im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach Inkubation mit einer 10 μM Lösung angegeben.

- Die Verbindung zeigte bei einer Konzentration von 10 μM eine Inhibition < 20 %, sodass kein IC₅₀-Wert bestimmt wurde.

n.b. nicht bestimmt

Bei den an Position 2 unsubstituierten Verbindungen **20a** und **20c** hatte die Einführung einer Methylgruppe im Vergleich zu den Verbindungen **19a–b** mit einem freien Stickstoffatom kaum Auswirkungen auf die DYRK1A-Aktivität. Dagegen führte ein Benzylsubstituent an Posi-

tion 1 (**20b** und **20d**) zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust an allen Kinasen der CMGC-Gruppe. Da die Einführung der Methylgruppe bei **20a** zu einer verbesserten Selektivität führte und zusätzlich zu DYRK1A nur CLK1 gehemmt wurde, sollte dieser Substituent auch in die potenten 2-Phenylverbindungen eingeführt werden, sodass die Verbindungen **20e–f** untersucht wurden. Im Vergleich zu **19e–f** führte die Methylgruppe zu einem 60- bis 90-fachen Rückgang der Aktivität und auch die bei **20a** gefundene Selektivität konnte für diese Verbindungen nicht beobachtet werden. Allerdings bewirkte auch bei den *N*-methylierten Verbindungen ein 7-Iodsubstituent eine verbesserte Inhibition im Vergleich zur analogen 7-Bromverbindung **20e**, wodurch nochmals bestätigt wird, dass Halogenbindungen mutmaßlich in die Ligand-Protein-Interaktion involviert sind. Die biologischen Ergebnisse der *N*-substituierten Verbindungen können nicht in Einklang mit den Ergebnissen der *docking*-Studien gebracht werden (Abbildung 2-12, Abbildung 2-14). Bei diesen Untersuchungen wurden die Substituenten im vorderen Bereich der Bindetasche positioniert, wo ausreichend Platz auch zur Aufnahme des voluminösen Benzylsubstituenten steht. Da aber auch der kleinere Methylsubstituent bereits zu starken Aktivitätseinbußen führte, scheint das unsubstituierte Indolstickstoffatom essentiell für eine hohe Affinität der Inhibitoren zur Kinase zu sein. Möglicherweise dient das Proton am Stickstoffatom als Wasserstoffbrückendonator für eine Interaktion mit einem Wassermolekül, das über ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit dem Rezeptor interagiert, wie es in der Kristallstruktur von KuFal194 (**18a**) beobachtet werden konnte (Abbildung 2-6). Die geometrische Auswertung der von GOLD erzeugten Pose für **19f** ergab, dass die Anordnung des Indolstickstoffatoms zum Wassermolekül einen für Wasserstoffbrückenbindungen typischen Abstand und Winkel von 2.97 Å bzw. 156° zeigte (Abbildung 4-4).¹²⁷ Daher scheint sich das für KuFal194 beobachtete Wasserstoffbrückennetzwerk auch bei den synthetisierten Indol-3-carbonitrilen **19** auszubilden und einen wichtigen Beitrag zur Bindungsaffinität der Inhibitoren zu leisten.

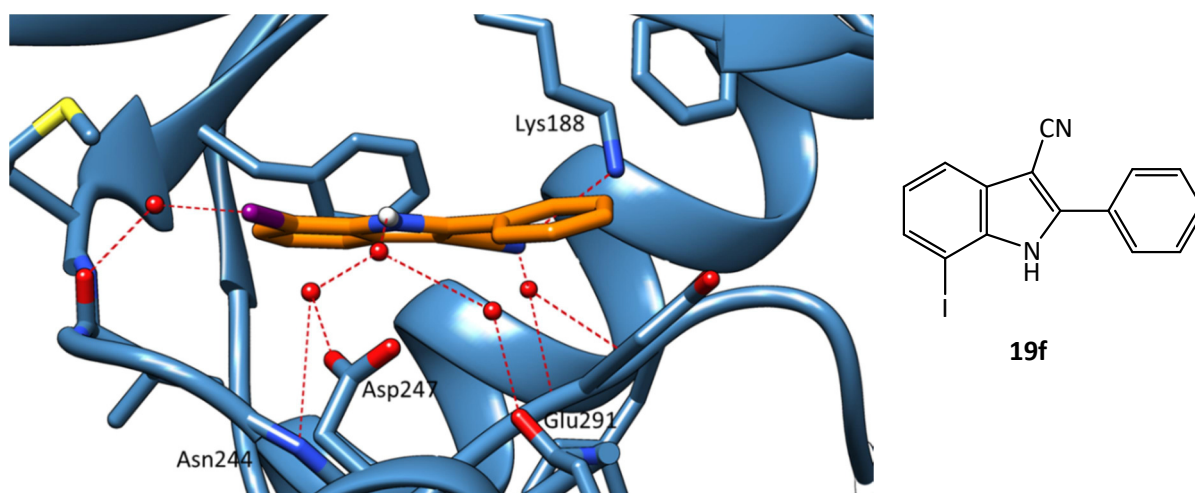


Abbildung 4-4: Analyse der *docking*-Pose von **19f** (orange) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (PDB: 4YLJ, blau). Das Proton am Indolstickstoffatom bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül, das über ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit dem Protein interagiert. Bindungsabstand und –winkel NH-H₂O: 2.97 Å, 155°.

Neben den hier analysierten Verbindungen wurden auch die Indol-3-carbonitrile **19u** und **20g–k** und die Indol-3-carbonsäuren **44a–b** auf ihre kinaseinhibitorische Aktivität untersucht. Die Ergebnisse lagen beim Erstellen dieser Arbeit aber noch nicht vor.

Die Zusammenfassung der beobachteten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zeigt, dass eine Substitution des Stickstoffatoms an Position 1 zu einem Aktivitätsverlust führt und somit die freie NH-Gruppe essentiell ist. In Position 2 des Indols führen unsubstituierte Phenylreste zu den aktivsten Verbindungen dieser Arbeit. Eine *para*-Substitution des Phenylrings mit Chlor bewirkt einen Aktivitätsverlust, eine Substitution mit Methoxygruppen in *meta*- oder *para*-Position und eine *para*-Hydroxygruppe werden dagegen toleriert. Aufgrund der lipophilen Oberfläche der ATP-Bindetasche führt der Austausch des Phenylrings an Position 2 gegen polare, aliphatische Reste nur zu einer schwachen Inhibition. Unpolare aliphatische Reste sowie ein Pyridin-3-ylring an Position 2 dagegen sind möglich und führen teilweise auch zu Inhibitoren mit IC₅₀-Werten im zweistellig nanomolaren Bereich. An Position 7 des Indols ist ein Halogensubstituent essentiell. Insbesondere Iod führt aufgrund der stärksten Halogenbindungen zu den potentesten Inhibitoren.

Eine Selektivität gegenüber den verwandten Kinasen DYRK1B und CLK1, wie sie KuFal194 zeigte, konnte mit den Indol-3-carbonitrilen nicht erreicht werden. Alle Verbindungen zeigten auch etwa vergleichbare Aktivität an CLK1 und häufig wurden auch DYRK1B und CLK4 gehemmt. Trotz der sehr ähnlichen ATP-Bindetasche von DYRK1B, die sich nur in einer Aminosäure von der Sequenz der Bindetasche von DYRK1A unterscheidet, deuten einzelne Bei-

spiele darauf hin, dass trotzdem eine selektive Hemmung von DYRK1A möglich ist. So zeigten die submikromolaren DYRK1A-Inhibitoren **19d** und **19g** ($IC_{50} = 0.040$ bzw. $0.233 \mu M$) keinerlei Aktivität an DYRK1B. Insgesamt war die potenteste Verbindung **19f** gleichzeitig auch die selektivste Verbindung. Mit einem IC_{50} -Wert von 10 nM zeigte sie neben einer 57-fachen Selektivität gegenüber DYRK1B immerhin auch eine acht- bzw. fünffache Selektivität gegenüber CLK1 und CLK4.

4.2 Aktivität in zellulären Assays

Um zu untersuchen, ob die Indol-3-carbonitrile nicht nur die isolierten Kinasen hemmen, sondern auch die DYRK1A-Aktivität in lebenden Zellen unterdrücken, wurden drei der potentesten DYRK1A-Inhibitoren (**19d**, **19f**, **19i**) in der Arbeitsgruppe von Prof. Walter Becker (Aachen, Deutschland) in einem Zellkulturassay getestet. Der *splicing*-Faktor 3B1 (SF3B1) ist ein Substrat von DYRK1A und wird von dieser an Threonin 434 phosphoryliert. Die Quantifizierung von phosphoryliertem T434 mittels eines pT434-spezifischen Antikörpers erlaubt die Bestimmung der endogenen Aktivität von DYRK1A.^{61, 128} Zur Beurteilung der zellulären Aktivität der Verbindungen wurden diese 48 h mit HeLa-Zellen inkubiert und anschließend die Menge an phosphoryliertem T434 bestimmt, die Rückschluss auf die DYRK1A-Aktivität gibt.^{61, 66, 102} Auch KuFal194 wurde in diesem SF3B1-Assay untersucht und zeigte dabei eine konzentrationsabhängige Hemmung der endogenen DYRK1A-Aktivität. Mit einem IC_{50} -Wert von $0.5 \mu M$ lag diese inhibitorische Aktivität aber deutlich unter der Aktivität in den Enzymassays ($IC_{50} = 0.006 \mu M$), was auf eine schlechte Membranpermeation zurückgeführt wurde.¹⁰²

Tabelle 4-6: Zytotoxizität der im SF3B1-Assay untersuchten Verbindungen an HeLa-Zellen.^a

	1 μM	3 μM	10 μM
19d	94	98	85
19f	97	97	87
19i	99	100	82
20b	94	94	66
Staurosporin ^b	20	-	-

a Viabilität der HeLa-Zellen in % im Vergleich zu mit DMSO versetzten Zellen ($n = 3$).

b Staurosporin diente als Positivkontrolle, da es als unspezifischer Kinaseinhibitor die Apoptose induziert.⁶⁶

Um auszuschließen, dass die Verbindungen **19d**, **19f** und **19i** eine toxische Wirkung auf die HeLa-Zellen haben, wurden sie zunächst in einem XTT-Assay untersucht. **20b** wurde in allen Versuchen als Negativkontrolle verwendet, da es in den Kinaseassays keine DYRK1A-Aktivität zeigte. Alle Verbindungen wiesen auch bei einer Konzentration von 3 μM , die ein Vielfaches der aktiven Konzentration in den Enzymassays darstellte, keine Toxizität auf (Tabelle 4-6). Die drei aktiven Verbindungen **19d**, **19f** und **19i** zeigten eine konzentrationsabhängige Inhibition der zellulären DYRK1A-Aktivität mit IC_{50} -Werten im submikromolaren Bereich. Wie erwartet zeigte **20b** (K46) auch bei einer Konzentration von 10 μM keine Inhibition der T434-Phosphorylierung. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Indol-3-carbonitrile DYRK1A auch in lebenden Zellen hemmen können, allerdings mit einer geringeren Aktivität als an den isolierten Enzymen. Dabei wies **19i** (KuRoM118) eine vergleichbare Aktivität wie KuFal194 (**18a**) auf. Die potentesten Indol-3-carbonitrile **19d** (KuRoM025) und **19f** (KuRoM039) sind mit einem IC_{50} -Wert von etwa 0.3 μM in lebenden Zellen sogar aktiver als KuFal194 (**18a**) (Abbildung 4-5).

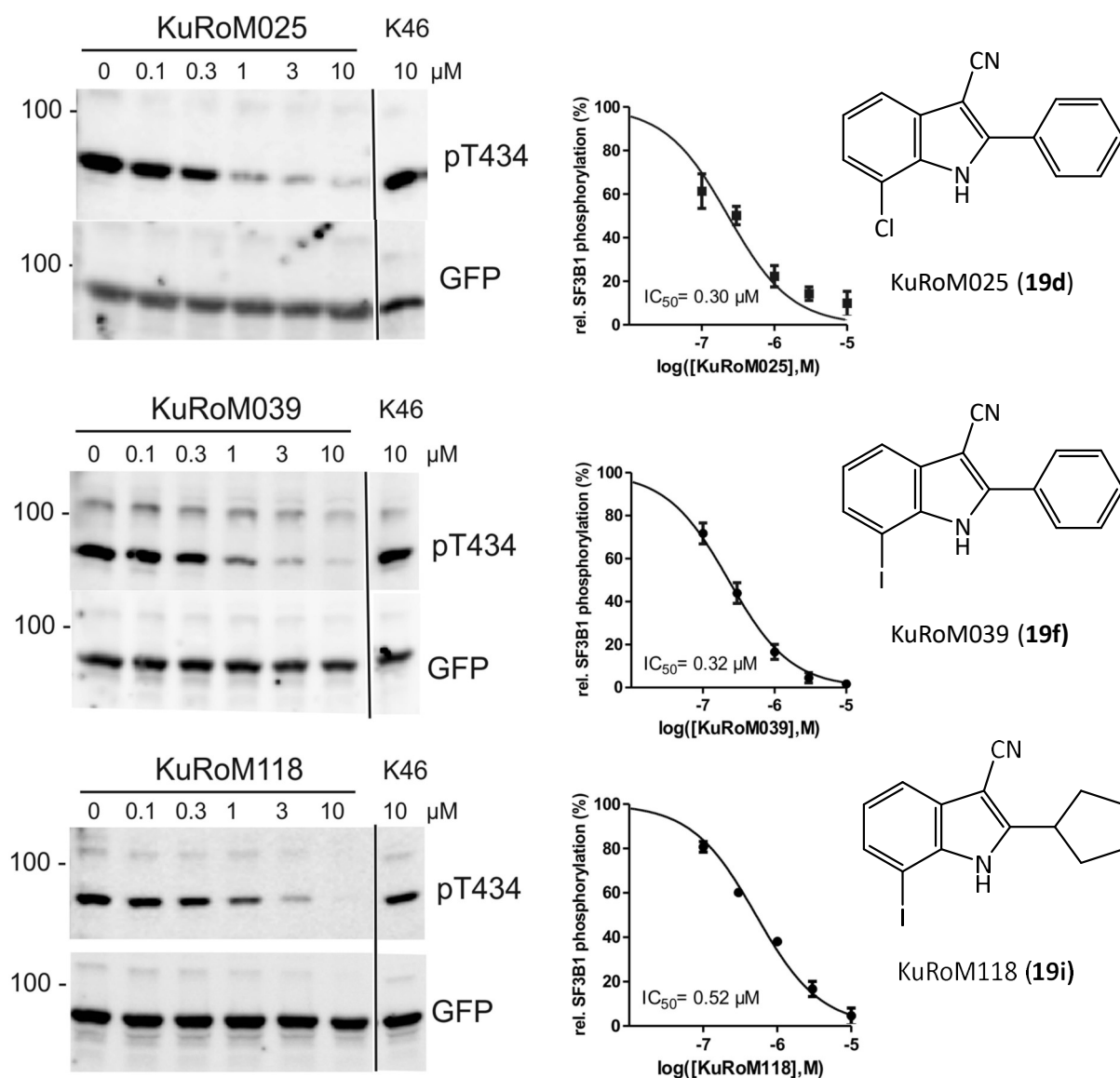


Abbildung 4-5: Hemmung der endogenen DYRK1A-Aktivität in HeLa-Zellen durch die Verbindungen **19d** (KuRoM025), **19f** (KuRoM039) und **19i** (KuRoM118). Links: GFP-SF3B1-NT exprimierende HeLa-Zellen wurden nach 18-stündiger Inkubation mit den Verbindungen lysiert und mittels *Western blot* immunologisch die Menge an phosphoryliertem Thr434 des SF3B1 im Zelllysat im Vergleich zur GFP-Menge bestimmt. Bei allen Verbindungen nimmt die Menge an pT434 mit zunehmender Inhibitor-konzentration ab. Das inaktive Derivat **20b** (K46) wurde als Negativkontrolle verwendet und zeigte auch bei 10 μM keine sichtbare Hemmung der SF3B1-Phosphorylierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Rechts: Die relative Menge an pT434 bezogen auf GFP im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (%) wurde über die Inhibitor-konzentration aufgetragen und der IC_{50} -Wert ermittelt. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte \pm SEM von zwei (**19i**) bzw. drei Messungen (**19d**, **19f**).

4.3 Zytotoxizität

Neben der DYRK1A-inhibitorischen Aktivität der Verbindungen in zellulären Assays wurden zwei Verbindungen auch auf ihre zytotoxischen Wirkungen gegenüber Krebszelllinien untersucht. Sowohl die Überexpression von DYRK1A als auch von der *splicing*-regulierenden Kinase CLK1, die von allen potenten DYRK1A-Inhibitoren mit vergleichbarer Aktivität gehemmt wurde, sind möglicherweise eine Ursache für die Entstehung von Tumoren.^{58, 129} Daher sollte die Wirkung der Inhibitoren auf ausgewählte Krebszellen untersucht werden. Als mögliche Therapieoption bei Alzheimer dagegen sollten DYRK1A- und CLK1-Inhibitoren möglichst keine zytotoxische Wirkung, speziell an gesunden Zellen, zeigen, sodass auch für diese potentielle Einsatzmöglichkeit eine Aussage über die Zytotoxizität der Substanzen von Bedeutung ist.

Die *N*-methylierte Verbindung **20f**, die sowohl DYRK1A als auch CLK1 mit submikromolarer Aktivität inhibierte (IC_{50} = 0.65 bzw. 0.6 μ M), wurde am *National Cancer Institute* (NCI) in den USA an 59 verschiedenen Krebszelllinien getestet. Eine 10 μ M Lösung der Verbindung zeigte dabei kaum Einfluss auf die Zellproliferation. Alle Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle mindestens ein Wachstum von 77 % (Abbildung 4-6). Trotz der submikromolaren DYRK1A- und CLK1-Inhibition zeigte die Verbindung damit keine zytotoxische Wirkung auf die getesteten Krebszellen.

Zusätzlich wurde der potenteste DYRK1A-Inhibitor **19f** (IC_{50} = 10 nM), der gleichzeitig auch zweistellig nanomolare Aktivität an CLK1 vorwies (IC_{50} = 80 nM), im Arbeitskreis von Prof. Ott (Braunschweig, Deutschland) an drei ausgewählten humanen Krebszelllinien auf proliferationshemmende Eigenschaften getestet. Dabei zeigte die Verbindung bei einer Konzentration von 100 μ M sowohl an der humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT-29, an der estrogensensitiven Brustadenokarzinomzelllinie MCF-7 und an der nicht hormonsensitiven Brustadenokarzinomzelllinie MDA-MB-231 keinerlei Toxizität und hemmte das Wachstum dieser Zellen nicht.

Tabelle 4-7: Zytotoxizität von **19f** an drei ausgewählten Krebszelllinien.^a

	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231
19f	> 100	> 100	> 100

a IC_{50} -Wert (μ M) als Mittelwert aus zwei Messungen.

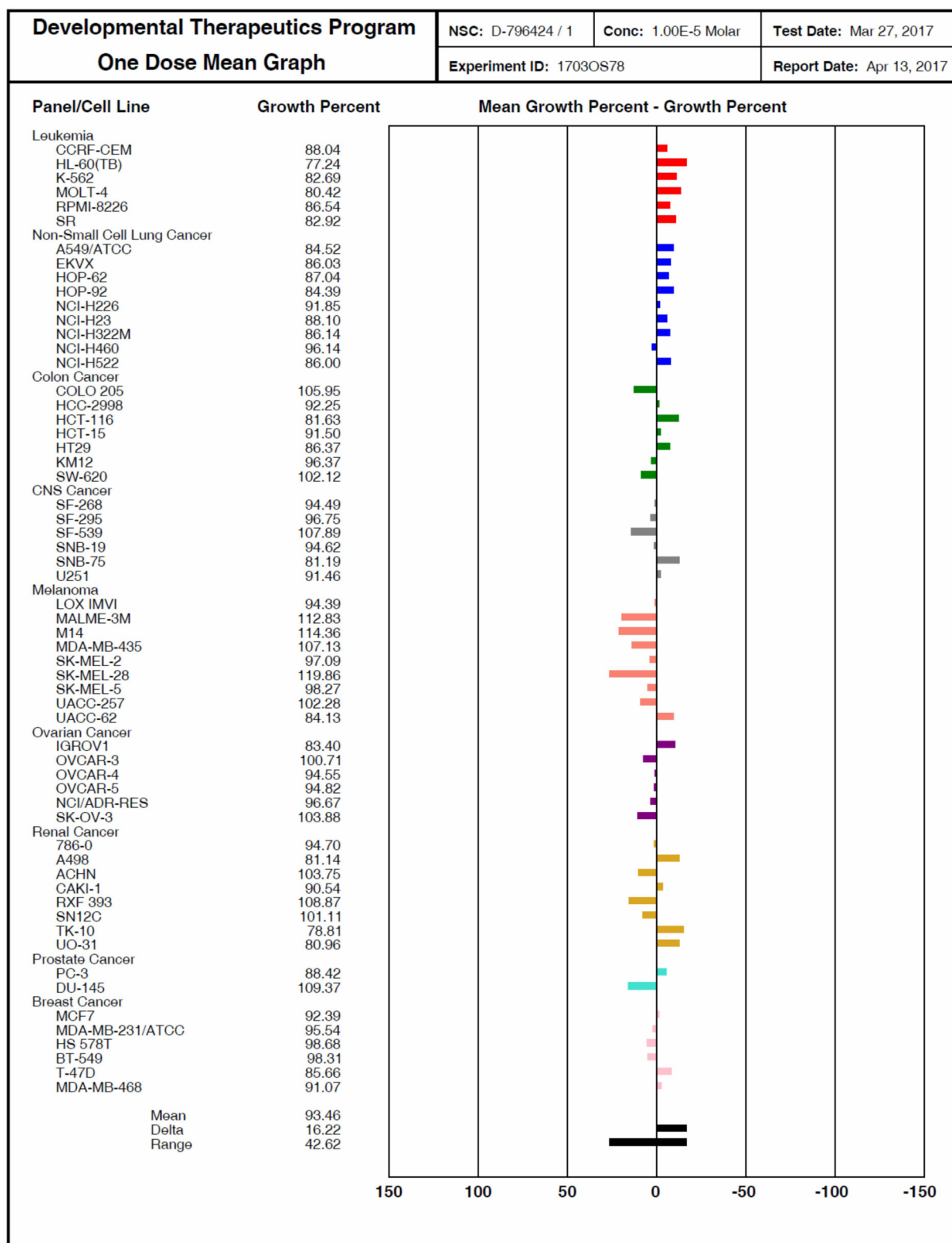


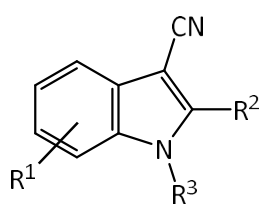
Abbildung 4-6: Hemmung der Zellproliferation der genannten Krebszelllinien durch die *N*-methylierte Verbindung **20f**. Es wurde das Wachstum der Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach Versetzen mit einer 10 μ M Lösung der Verbindung bestimmt. Im Diagramm ist jeweils die Differenz zwischen dem mittleren Wachstum über alle Zelllinien und dem gemessenen Wachstum der jeweiligen Zelllinie als Balken dargestellt. Ein Balken nach links zeigt dabei eine geringere Sensitivität, ein Balken nach rechts eine erhöhte Sensitivität für die Substanz im Vergleich zum Mittel an.

5 Physikochemische Eigenschaften

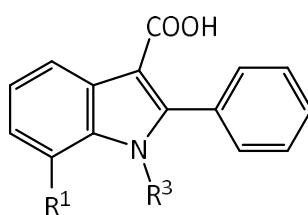
Zur Beurteilung der physikochemischen Eigenschaften der synthetisierten Indol-3-carbonitrile **19**, **20** und **21** sowie der Indol-3-carbonsäuren **44** wurden von allen Verbindungen die relevanten Parameter für die Lipinski's *rule of five* und außerdem von den aktiven Verbindungen sowohl LLE als auch LE berechnet. Damit sollten während der Entwicklung die für die Bioverfügbarkeit der Substanzen bedeutsamen Eigenschaften bewertet werden. Die *rule of five*-Parameter konnten bereits vor der Synthese berechnet werden, sodass neue Substituenten auch im Hinblick auf den Einfluss auf diese Eigenschaften ausgewählt wurden. Da in die Berechnung der LLE und der LE die biologische Aktivität der Verbindungen einfließt, konnten diese Werte erst nach der Synthese und biologischen Testung ermittelt werden. Auch LLE und LE erlauben eine Abschätzung der Bioverfügbarkeit der Substanzen und dienen dazu, geeignete Kandidaten für die weitere Optimierung und weitere biologische Untersuchungen auszuwählen. In die Vergleiche wurde auch KuFal194 (**18a**) einbezogen, da die Indol-3-carbonitrile Strukturanaloga der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren darstellen und mit dem Ziel der Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften entwickelt wurden.

Alle synthetisierten Verbindungen und auch KuFal194 (**18a**) erfüllen die Lipinski's *rule of five*. Die molare Masse aller Strukturen liegt deutlich unter 500 g/mol und auch die Zahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donatoren liegt unter den beschriebenen Werten von 10 bzw. 5, die für eine gute Permeation und Absorption nach oraler Verabreichung der Verbindungen eingehalten werden sollten (Tabelle 5-1).⁹³

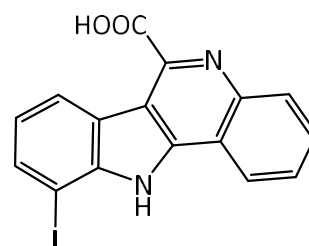
Tabelle 5-1: Berechnung der *rule of five*-Parameter aller synthetisierten Verbindungen **19**, **20**, **21**, **44** und von KuFal194 (**18a**).



19, 20, 21



44



18a

Fortsetzung Tabelle 5-1: Berechnung der *rule of five*-Parameter aller synthetisierten Verbindungen **19**, **20**, **21**, **44** und von KuFal194 (**18a**).

	R ¹	R ²	R ³	Relative Molmasse	logP ^a	H-Brücken-Donatoren	H-Brücken-Akzeptoren
KuFal194 (18a)	-	-	-	388.16	4.22	2	3
19a	7-Cl	H	H	176.60	2.53	1	1
19b	7-Br	H	H	221.05	2.70	1	1
19c	7-I	H	H	268.05	2.86	1	1
19d	7-Cl	Phenyl	H	252.70	4.10	1	1
19e	7-Br	Phenyl	H	297.15	4.26	1	1
19f	7-I	Phenyl	H	344.15	4.42	1	1
19g	7-I	4-H ₃ CO-Phenyl	H	374.18	4.27	1	2
19h	7-I	3-H ₃ CO-Phenyl	H	374.18	4.27	1	2
19i	7-I	Cyclopentyl	H	336.17	4.37	1	1
19j	7-I	Isopropyl	H	310.13	3.94	1	1
19k	7-I	Cyclopropyl	H	308.12	3.48	1	1
19l	7-Cl	Allyl	H	216.67	3.39	1	1
19m	7-Cl	2-(1,3-Dioxan-2-yl)ethyl	H	290.74	2.84	1	3
19n	5-I	H	H	267.95	2.86	1	1
19o	7-CH ₃	Phenyl	H	232.28	4.01	1	1
19p	7-Cl	4-H ₃ CO-Phenyl	H	282.72	3.94	1	2
19q	7-Cl	4-Cl-Phenyl	H	287.14	4.70	1	1
19r	7-I	4-Cl-Phenyl	H	378.59	5.03	1	1
19s	7-I	Pyridin-3-yl	H	345.14	3.21	1	2
19t	H	Phenyl	H	218.25	3.50	1	1
19u	7-I	3-OH-Phenyl	H	360.15	4.12	2	2
19v	7-Cl	4-OH-Phenyl	H	268.70	3.80	2	2
20a	7-Br	H	CH ₃	235.08	2.92	0	1
20b	7-Br	H	Benzyl	311.18	4.65	0	1
20c	7-Cl	H	CH ₃	190.63	2.76	0	1
20d	7-Cl	H	Benzyl	266.72	4.48	0	1
20e	7-Br	Phenyl	CH ₃	311.18	4.49	0	1
20f	7-I	Phenyl	CH ₃	358.18	4.65	0	1
20g	H	Phenyl	CH ₃	232.29	3.72	0	1
20h	7-Cl	Phenyl	CH ₃	266.73	4.32	0	1
20i	7-I	3-H ₃ CO-Phenyl	CH ₃	388.21	4.49	0	2
20j	7-I	Isopropyl	CH ₃	324.17	4.17	0	1
20k	7-I	Cyclopentyl	CH ₃	350.20	4.59	0	1
21	7-Cl	2,3-Di-hydroxypropyl	H	250.68	1.11	3	3
44a	Cl	-	H	271.70	3.90	2	2
44b	Br	-	H	330.18	4.29	1	2

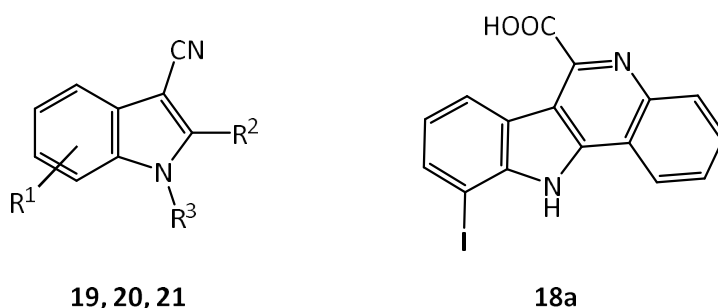
a Die logP-Werte wurden mit MarvinSketch¹³⁰ berechnet.

Der logP-Wert der Verbindungen wurde mit dem Programm MarvinSketch¹³⁰ von ChemAxon berechnet und ist der dekadische Logarithmus eines anhand von Strukturmerkmalen vorhergesagten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und damit ein Maß für die Lipophilie der Substanzen. Nach der *rule of five* sollte der logP-Wert nicht größer als fünf sein. Diese Anforderung wird von allen Verbindungen erfüllt, wenn auch **19r** mit einem logP von 5.03 direkt auf der Grenze liegt. Der logP-Wert einer Verbindung ist nicht nur für die Permeation und Absorption der Substanz nach oraler Gabe wichtig, sondern auch zur Beurteilung der Löslichkeit. Auch die Auflösung eines Arzneistoffs nach peroraler Verabreichung ist Voraussetzung für dessen Wirksamkeit. Je hydrophiler eine Verbindung ist, desto besser wird sie vermutlich hydratisiert und ist damit in wässrigen Medien besser löslich.⁹¹ Die Ausgangsverbindung **19a** hat einen logP-Wert von 2.53 und weist damit eine akzeptable Lipophilie auf. Der logP-Wert der Leitstruktur darf nicht zu hoch sein, da dieser während der Arzneistoffentwicklung in der Regel steigt.⁹² Gerade bei Kinasen sind die Oberflächen der Bindestellen hydrophob, sodass durch die Einführung lipophiler Substituenten in die Leitstruktur größere Bereiche der Binde-tasche besetzt und damit die Affinität zum *target* erhöht werden kann.⁹³ Gleichzeitig wirkt sich die Erhöhung der Lipophilie aber negativ auf die Löslichkeit der Substanzen und damit auf die mögliche Anwendung als Arzneistoff aus. Auch in diesen Untersuchungen führte bereits der Austausch des 7-Chlorsubstituenten gegen Brom und Iod zu einem Anstieg der Lipophilie, gleichzeitig aber auch zu höherer Aktivität. Auch die Einführung von Substituenten in die Position 2 des Indolgrundkörpers ging mit einer Erhöhung der Lipophilie einher. Insbesondere die Einführung der Phenylsubstituenten (**19d–f**), die zu den potentesten Verbindungen führten, bedingte einen deutlichen Anstieg des logP-Wertes. Der logP-Wert der potentesten Verbindung **19f** ist mit 4.42 sogar höher als der von KuFal194 (**18a**), das einen logP-Wert von 4.22 hat und deren physikochemische Eigenschaften durch Verkleinerung des aromatischen Systems verbessert werden sollten. Aufgrund der hohen Lipophilie dieser Verbindung wurde in den weiteren Synthesepfanungen versucht, die Lipophilie durch Variation des Restes an Position 2 wieder zu senken. Die Einführung von Methoxygruppen am Phenylring (**19g–h**, **19p**) führte zu einer leichten Erhöhung der Hydrophilie, die durch die Etherspaltung (**19u–v**) noch etwas weiter verbessert wurde. Der Austausch des Phenylsubstituenten in **19f** gegen einen Pyridin-3-ylrest (**19s**) führte zu einer deutlichen Zunahme der Hydrophilie, der logP-Wert konnte dadurch über eine Zehnerpotenz auf 3.21 gesenkt werden. Auch der Austausch der Phenylsubstituenten gegen aliphatische Reste (**19i–m**) senkte den logP-Wert.

Dabei fällt auf, dass ein Cyclopentylrest (**19i**) im Vergleich mit **19f** kaum eine Senkung der Lipophilie bewirkte, ein Cyclopropylrest (**19k**) den logP-Wert dagegen um fast eine Zehnerpotenz senkte. Die polarste Verbindung wurde durch Einführung einer 2,3-Dihydroxypropylseitenkette (**21**) erzeugt, die sogar im Vergleich zur Leitstruktur **19a** eine erhöhte Hydrophilie aufwies, aber auch etwa nur vergleichbare Aktivität an DYRK1A zeigte.

Die Betrachtung der logP-Werte zeigt einerseits, dass durch viele Modifikationen eine Abnahme der Lipophilie im Vergleich zur Verbindung **19f** erreicht wurde und dass andererseits in allen Fällen diese strukturellen Veränderungen mit einer verringerten Aktivität einhergingen. Daher wurde durch die Berechnung des LLE-Wertes die Lipophilie auch in Bezug auf die Aktivität der Verbindungen bewertet. Zusätzlich wurde die LE betrachtet, die die Aktivität ins Verhältnis zur Molekülgröße setzt. Da Arzneistoffe während der Entwicklung durch die Einführung von Substituenten in der Regel größer und meist lipophiler werden, ist es wichtig, die Aktivität nicht nur isoliert zu beurteilen. Der LE-Wert sollte für potentielle Arzneistoffkandidaten größer als 0.3 kcal/mol sein. Dies wird von allen aktiven Verbindungen erfüllt.⁹⁶ Das Ziel der Verkleinerung von **18a** wurde mit den Indol-3-carbonitrilen erfüllt, sodass die LE der potentesten Verbindung **19f** im Vergleich zu **18a** verbessert werden konnte. Den besten LE-Wert aller Verbindungen zeigte **19c** mit 0.729, da sie bei niedriger molarer Masse DYRK1A im mittleren submikromolaren Bereich hemmte (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2: Berechnung der LLE und LE für die an DYRK1A aktiven Verbindungen **19**, **20** und **21** und Vergleich mit KuFal194 (**18a**).



	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ DYRK1A (μM)	LLE ^a	LE ^b
KuFal194 (18a)	-	-	-	0.006	4.00	0.536
19a	7-Cl	H	H	3.30	2.95	0.626
19b	7-Br	H	H	1.10	3.26	0.680

Fortsetzung Tabelle 5-2: Berechnung der LLE und LE für die an DYRK1A aktiven Verbindungen **19**, **20** und **21** und Vergleich mit KuFal194 (**18a**).

	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ DYRK1A (μM)	LLE ^a	LE ^b
19c	7-I	H	H	0.41	3.53	0.729
19d	7-Cl	Phenyl	H	0.040	3.30	0.563
19e	7-Br	Phenyl	H	0.025	3.34	0.579
19f	7-I	Phenyl	H	0.010	3.58	0.609
19g	7-I	4-OCH ₃ -Phenyl	H	0.233	2.36	0.454
19h	7-I	3-OCH ₃ -Phenyl	H	0.210	2.41	0.457
19i	7-I	Cyclopentyl	H	0.07	2.78	0.577
19j	7-I	Isopropyl	H	0.28	2.61	0.598
19k	7-I	Cyclopropyl	H	0.14	3.37	0.626
19l	7-Cl	Allyl	H	0.690	2.77	0.563
19m	7-Cl	2-(1,3-Dioxan-2-yl)ethyl	H	3.9	2.57	0.371
19n	5-I	H	H	1.3	3.03	0.672
19s	7-I	Pyridin-3-yl	H	0.08	3.89	0.540
19t	H	Phenyl	H	0.4	2.90	0.516
19v	7-Cl	4-OH-Phenyl	H	0.1	3.20	0.505
20a	7-Br	H	CH ₃	1.9	2.80	0.603
20e	7-Br	Phenyl	CH ₃	2.3	1.15	0.407
20f	7-I	Phenyl	CH ₃	0.65	1.54	0.446
21	7-Cl	2,3-Dihydroxypropyl	H	2	4.59	0.459

a Die LLE wurde nach der Formel $LLE = pIC_{50} - \log P$ berechnet. Es wurde der logP-Wert aus Tabelle 5-1 übernommen, der mit MarvinSketch¹³⁰ berechnet wurde.

b Die LE wurde nach der Formel $LE = \frac{1.37 \text{ kcal/mol}}{HA} * pIC_{50}$ berechnet. HA ist dabei die Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome.

Die *ligand-lipophilicity efficiency* (LLE) verknüpft die Aktivität mit dem logP-Wert, also der Lipophilie der Verbindungen. LEESON *et al.* bewerten die Lipophilie von Substanzen als die wichtigste physikochemische Eigenschaft und schätzen die Bedeutung der LLE daher höher ein als die der LE.⁹⁴ Unter der Annahme, dass vielversprechende Arzneistoffkandidaten einen logP-Wert kleiner als 3 und einen IC₅₀-Wert kleiner als 10 nM aufweisen, sollte die LLE etwa zwischen 5 und 7 liegen.⁹⁶ Aufgrund der guten Aktivität an DYRK1A liegt die LLE von KuFal194 (**18a**) trotz hoher Lipophilie bei 4.00. Damit liegt der Wert trotzdem noch deutlich

unter dem geforderten Minimalwert von 5. Die LLE der Indol-3-carbonitrile konnte im Vergleich zu **18a** nicht verbessert werden. Die potenteste Verbindung **19f** weist eine LLE von 3.58 auf. Durch den Austausch des Phenylrings gegen einen Pyridin-3-ylrest (**19s**) konnte dieser Wert leicht auf 3.89 verbessert werden. Den höchsten Wert erreicht die Dihydroxyverbindung **21**, deren LLE mit 4.59 sogar im Vergleich zu **18a** verbessert wurde. Dieser hohe LLE-Wert wird aber stark von der geringen Lipophilie beeinflusst, da die Aktivität mit 2 μM sehr gering ist. Daher darf auch die LLE nicht ohne kritische Betrachtung zur Bewertung der Verbindungen herangezogen werden.

5.1 Bestimmung der Löslichkeit

Zusätzlich zur Berechnung der Lipophilie und der *rule of five*-Eigenschaften wurden von ausgewählten Substanzen die thermodynamische und die kinetische Löslichkeit beim physiologischen pH-Wert 7.4 bestimmt. Außerdem wurde mit dem integrierten *plugin* von MarvinSketch¹³⁰ die Löslichkeit der Verbindungen bei pH 7.4 vorhergesagt und diese Werte mit den experimentellen Daten verglichen (Tabelle 5-3). Die Wasserlöslichkeit von potentiellen Arzneistoffen hat Einfluss auf alle ADME-Eigenschaften und spielt daher eine große Rolle in der Arzneistoffentwicklung.^{95, 131} Arzneistoffe sollten eine Löslichkeit über 60 $\mu\text{g/mL}$ aufweisen, was bei einer molaren Masse von 300 g/mol einer Löslichkeit von 200 μM entspricht.^{95, 100} Die intrinsische Löslichkeit S_0 beschreibt die thermodynamische Löslichkeit der ungeladenen Form der Substanz. In dieser Arbeit wurde die Löslichkeit bei pH 7.4 gemessen und mit MarvinSketch auch für diesen pH-Wert vorhergesagt. Für die Nitrile entspricht die intrinsische Löslichkeit der Löslichkeit bei pH 7.4. Nur die Carbonsäure KuFal194 (**18a**) kann bei pH 7.4 möglicherweise deprotoniert vorliegen, sodass die berechnete Löslichkeit bei pH 7.4 deutlich höher liegt als die intrinsische Löslichkeit ($S_{\text{pH } 7.4} = 13183 \mu\text{M}$; $S_0 = 1.58 \mu\text{M}$).

Die thermodynamische Löslichkeit wurde nach einer im Arbeitskreis etablierten *shake flask* Methode bestimmt.¹³² Dazu wurden 500 μg der Substanz in Whatman Mini-UniPrep Filter Vials eingewogen und mit 400 μL eines Phosphatpuffers (pH 7.4) versetzt. Die Proben wurden für 24–72 h bei 25 °C und 400 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Da die thermodynamische Löslichkeit die Löslichkeit im Gleichgewicht mit der kristallinen Form beschreibt, wurde nach 24, 48 und 72 h die gesättigte Lösung durch Filtration vom Feststoff abgetrennt und die Konzentration der Substanz im Filtrat mittels HPLC bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte über eine extern erstellte Kalibriergerade. Wurden nach 24 h und 48 h vergleichbare

Messwerte erhalten, entfiel die Messung nach 72 h. Hatte sich allerdings nach 72 h noch kein Gleichgewicht eingestellt, wurde eine weitere Probe nach 96 h vermessen. Häufig war die Löslichkeit so gering, dass mit dem UV-Detektor der HPLC kein Signal detektiert werden konnte. In diesen Fällen konnte keine exakte Löslichkeit bestimmt, sondern nur festgestellt werden, dass diese unterhalb der kleinsten bei der Kalibrierung vermessenen Konzentration liegt.

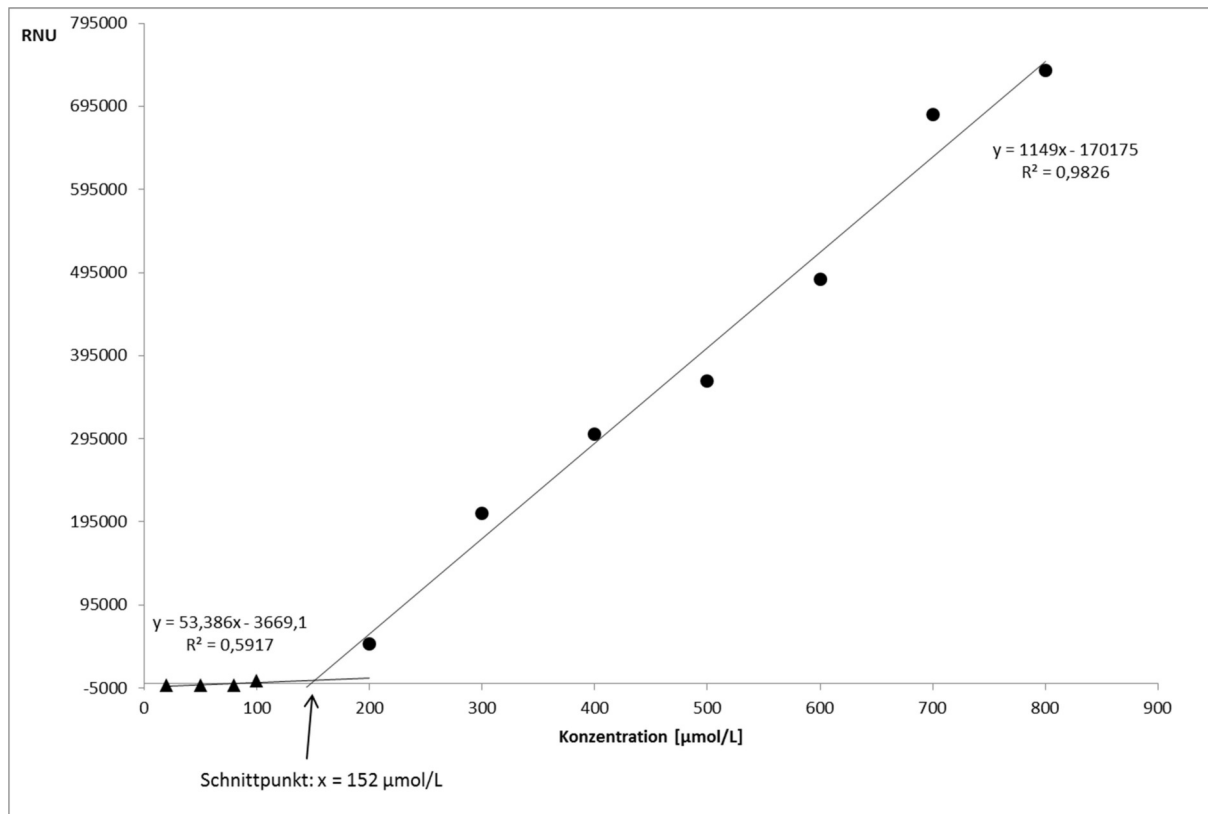


Abbildung 5-1: Auswertung der nephelometrischen Bestimmung der kinetischen Löslichkeit von **19b**. Die Intensität des Streulichts (angegeben in *relative nephelometric unit* (RNU)) wurde über der Konzentration aufgetragen. Die kinetische Löslichkeit lässt sich aus dem Schnittpunkt der beiden Geraden A und B ablesen. Gerade A (Dreiecke) wurde durch die Messwerte erhalten, bei denen keine Präzipitation gemessen wurde. Gerade B (Kreise) wurde durch die Messwerte gelegt, bei denen das Signal durch Präzipitation mit steigender Konzentration zunahm.

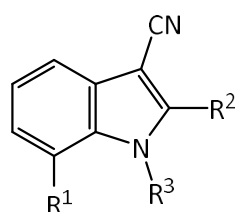
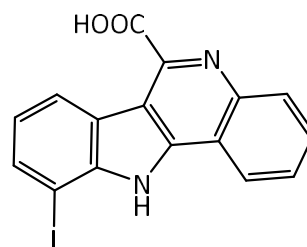
Die kinetische Löslichkeit ist die Löslichkeit der am schnellsten präzipitierenden Form und wird nicht im thermodynamischen Gleichgewicht bestimmt. Zur Messung der kinetischen Löslichkeit wurde eine neue Methode, angelehnt an literaturbeschriebene Methoden, entwickelt.^{93, 133} Dazu wurde eine Stammlösung der Substanz in DMSO und aus dieser eine Verdünnungsreihe hergestellt, sodass acht bis elf Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen erhalten wurden. Diese Lösungen wurden in eine 96 *well*-Platte pipettiert und 1:100 mit

Phosphatpuffer (pH 7.4) verdünnt, sodass die DMSO-Konzentration in der vermessenen Lösung 1 % betrug. Da DMSO ein Löslichkeitsvermittelnder Zusatz ist, wurde versucht, dessen Konzentration möglichst gering zu halten. Die Proben auf der Platte wurden mit einem Nephelometer vermessen. Dabei wird die Probe mit einem Laser bestrahlt, dessen Licht durch ungelöste Partikel gestreut wird. Die Intensität des gestreuten Lichts wird gemessen und ist proportional zur Konzentration der suspendierten Partikel. Solange die Substanz vollständig gelöst ist, wird somit nur ein Signal in Höhe des Blindwertes gemessen.¹³³ Die Intensität des gemessenen Streulichts wurde über der Konzentration aufgetragen und die kinetische Löslichkeit ergab sich durch den Schnittpunkt zweier Geraden (Abbildung 5-1).

Die Löslichkeit von KuFal194 (**18a**) war wie erwartet sehr gering. Die thermodynamische Löslichkeit lag unter 0.5 μM und auch die kinetische Löslichkeit ist mit 5.28 μM deutlich niedriger als die für Arzneistoffe geforderte Löslichkeit. Dagegen zeigte die Ausgangsverbindung dieser Arbeit **19a** eine bessere thermodynamische Löslichkeit von 143 μM , die aber auch bereits unterhalb des Zielwertes von 200 μM lag. Aufgrund der zunehmenden Lipophilie nahm die thermodynamische Löslichkeit durch den Austausch des 7-Chlorsubstituenten gegen Brom bzw. Iod ab. Interessanterweise war dieser Effekt bei der kinetischen Löslichkeit umgekehrt. Die kinetische Löslichkeit von **19a** war trotz des DMSO-Zusatzes kleiner als die thermodynamische Löslichkeit und stieg durch den Austausch von Chlor gegen Brom und Iod an. Mit einer kinetischen Löslichkeit von 261 μM zeigte die 7-Iodverbindung **19c** als einziger submikromolarer Inhibitor von DYRK1A in einem der beiden Assays eine Löslichkeit oberhalb des Zielwertes von 200 μM . Die Einführung des 2-Phenylsubstituenten führte zu einer deutlichen Verschlechterung der Löslichkeit und die kinetische Löslichkeit des potentesten Inhibitors **19f** war vergleichbar mit der von **18a**. Der Austausch des Phenylrings gegen einen Pyridin-3-ylrest (**19s**) oder die Einführung von Methoxysubstituenten (**19g–h**) führte zu einer leichten Verbesserung der kinetischen Löslichkeit. Dabei war die Löslichkeit des *para*-substituierten Derivats **19g** etwa doppelt so groß wie die des *meta*-substituierten Isomers **19h**.

Die Einführung der polaren 2,3-Dihydroxypropylkette an Position 2 führte wie erhofft zu einer deutlichen Verbesserung der Löslichkeit und mit einer thermodynamischen Löslichkeit von 3447 μM weist diese Verbindung eine für die Verwendung als Arzneistoff geeignete Löslichkeit auf. Da **21** aber nur ein schwacher DYRK1A-Inhibitor ist und polare Verbindungen in der Bindetasche nur schlecht toleriert wurden, sollte versucht werden, die Löslichkeit durch

Erhöhung des Anteils gesättigter Kohlenstoffatome zu verbessern. Der Anteil an gesättigten Kohlenstoffatomen (F_{sp^3}) beschreibt das Verhältnis der Anzahl an sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen zur Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen.¹³⁴ Aromatische Strukturen mit einem niedrigen F_{sp^3} sind planar und bilden daher im Kristallgitter starke Interaktionen untereinander, was sich auch in einem hohen Schmelzpunkt ausdrückt. Durch die Einführung aliphatischer Reste und die Erhöhung des F_{sp^3} wird die Planarität der Moleküle vermindert, die Anordnung im Kristallgitter gestört und gleichzeitig der Schmelzpunkt gesenkt. Diese Annahme findet sich auch in der Yalkowski-Gleichung wider, die eine einfache Abschätzung der Wasserlöslichkeit erlaubt. In die Gleichung fließt neben dem logP-Wert als Maß der Lipophilie der Schmelzpunkt als Maß für die Kristallgitterenergie ein. Nimmt der Schmelzpunkt durch Erhöhung des Anteils gesättigter Kohlenstoffatome ab, führt dies zu einer verbesserten Löslichkeit.⁹⁸ ISHIKAWA *et al.* konnten zeigen, dass einerseits die Störung der Planarität von Molekülen durch die Einführung aliphatischer Gruppen positiven Einfluss auf die Löslichkeit hat und dass andererseits die Löslichkeit durch diese Modifikation trotz zunehmender Lipophilie verbessert werden kann.⁹⁸ Daher wurde in dieser Arbeit der Phenylring an Position 2 gegen aliphatische Reste getauscht und eine zusätzliche Methylgruppe an Position 1 eingeführt. Während die Einführung der Methylgruppe in Verbindung **19b** zu einer drastischen Verschlechterung der thermodynamischen Löslichkeit führte (**20a**), ergab diese Strukturmodifikation bei **20f** im Vergleich zu **19f** trotz zunehmender Lipophilie eine etwa 8-fach höhere kinetische Löslichkeit. Der Austausch des Phenylrings gegen cyclische aliphatische Reste (**19i**, **19k**) verbesserte die kinetische Löslichkeit um den Faktor 3 bis 8. Dabei verminderte sich die Löslichkeit mit zunehmender Größe des Restes. Interessanterweise führte ein Austausch des Phenylrings gegen einen Isopropylrest zu einer ähnlich niedrigen kinetischen Löslichkeit (**19j**). Damit zeigte sich, dass auch bei den Indol-3-carbonitrilen eine Störung der Planarität der Moleküle in vielen Fällen zu einer Verbesserung der Löslichkeit führte. Vergleicht man die Messwerte mit den zuvor berechneten Werten, zeigt sich, dass in den meisten Fällen eine zu hohe Löslichkeit vorhergesagt wurde, nur für **21** wurde die Löslichkeit vom Vorhersagetool unterschätzt. Allerdings konnten die relativen Einflüsse der Substituenten auf die Löslichkeit meist korrekt vorhergesagt werden.

Tabelle 5-3: Vorhersage und Bestimmung der thermodynamischen und kinetischen Löslichkeit bei pH 7.4 von ausgewählten Indol-3-carbonitrilen und KuFal194 (**18a**).**19, 20, 21****18a**

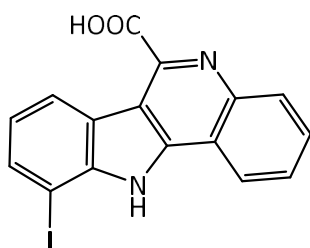
	R ¹	R ²	R ³	S _{pH 7.4 calc.} ^a [μM]	S _{therm., pH7.4} ^b [μM]	S _{kin., pH 7.4} ^c [μM]
KuFal194 (18a)	-	-	-	13183	< 0.5	5.28 (4.99–5.57)
19a	Cl	H	H	525	143 ± 6.3	116 ± 14
19b	Br	H	H	224	136 ± 11	142 ± 14
19c	I	H	H	263	45.2 (44.8–45.6)	261 (254–267)
19d	Cl	Phenyl	H	2.63	< 0.5	14.7 ± 4.5
19e	Br	Phenyl	H	1.26	< 0.5	14.8 ± 0.26
19f	I	Phenyl	H	1.66	< 0.5	4.57 (4.11–5.03)
19g	I	4-H ₃ CO-Phenyl	H	1.86	n.b.	15.0 (14.3–15.8)
19h	I	3-H ₃ CO-Phenyl	H	1.86	n.b.	8.54 (7.23–9.84)
19i	I	Cyclopentyl	H	3.80	< 0.5	16.2 (15.2–17.3)
19j	I	Isopropyl	H	26.9	< 0.5	5.47 (4.11–5.03)
19k	I	Cyclopropyl	H	37.2	n.b.	38.1 (37.6–38.6)
19s	I	Pyridin-3-yl	H	25.1	n.b.	10.0 (7.21–12.9)
20a	Br	H	CH ₃	1514	1.81 (1.73–1.89)	n.b.
20f	I	Phenyl	CH ₃	12.0	< 0.5	37.5 (36.6–38.4)
21	Cl	2,3-Dihydroxypropyl	H	912	3447 ± 182	n.b.

n.b. nicht bestimmt

- a Der logS-Wert (dekadischer Logarithmus der Löslichkeit in mol/L) bei pH 7.4 wurde mit MarvinSketch¹³⁰ berechnet. Aus dem logS-Wert wurde die Löslichkeit S_{calc.} berechnet.
- b Die thermodynamische Löslichkeit wurde mittels einer *shake flask* Methode in einem Phosphatpuffer (pH 7.4) bestimmt. Es wurden zwei (Angabe des Mittelwerts und der Spanne) oder drei (Angabe des Mittelwerts ± SD) unabhängige Messungen durchgeführt. War das gemessene Signal der Probe kleiner als das Signal der kleinsten bei der Kalibrierung vermessenen Konzentration, ist die Löslichkeit als < 0.5 μM angegeben.
- c Die kinetische Löslichkeit wurde mit einer nephelometrischen Methode bestimmt. Es wurden zwei (Angabe des Mittelwerts und der Spanne) oder drei (Angabe des Mittelwerts ± SD) unabhängige Messungen durchgeführt.

6 Zusammenfassung

Die Proteinkinase DYRK1A stellt eine interessante Zielstruktur zur Entwicklung neuer Inhibitoren dar, da ihre Überexpression vermutlich eine Ursache für die kognitiven Einschränkungen bei Menschen mit Down-Syndrom ist und die erhöhte Aktivität auch mit der Entwicklung der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebracht wird. Von FALKE wurden 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren als potente Inhibitoren von DYRK1A identifiziert. Dabei stellte KuFal194 (**18a**) die aktivste und gleichzeitig selektivste Verbindung dar. Aufgrund des großen aromatischen Systems ist diese Verbindung allerdings sehr lipophil und nahezu unlöslich in Wasser, weshalb sie nicht als potentieller Arzneistoff geeignet ist. Daher wurde durch Verkleinerung des Grundkörpers das Fragment **19a** konstruiert, das verbesserte physikochemische Eigenschaften aufwies.

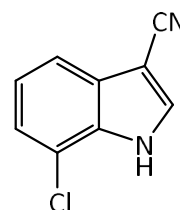


KuFal194 (18a)

IC_{50} DYRK1A = 6 nM

$\log P = 4.22$

$S_{kin., pH 7.4} = 5.28 \mu M$



19a

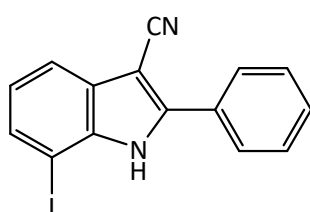
IC_{50} DYRK1A = 3300 nM

$\log P = 2.53$

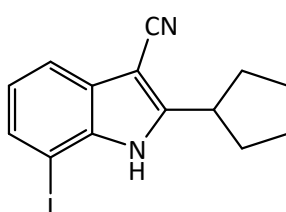
$S_{kin., pH 7.4} = 116 \mu M$

Ausgehend von **19a** sollten in dieser Arbeit neue DYRK1A-Inhibitoren mit verbesserten Löslichkeitseigenschaften entwickelt werden. Durch *docking*-Studien wurde zunächst ein möglicher Bindemodus in der ATP-Bindetasche der Proteinkinase identifiziert, der als Grundlage für Modifikationen des Fragments **19a** diente. Der Halogensubstituent an Position 7 interagiert über eine wasservermittelte Halogenbindung mit der *hinge*-Region und die Nitrilgruppe bildet Interaktionen zum konservierten Lys188 aus, sodass diese beiden Strukturmerkmale beibehalten wurden. Durch Austausch des 7-Chlorsubstituenten gegen andere Halogene und Einführung weiterer Substituenten an Position 1 und 2 des Indolkörpers wurden neue Derivate mit verbesserter Aktivität synthetisiert und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Indol-3-carbonitrile untersucht. Zur Synthese dieser Verbindungen wurde eine neue Syntheseroute entwickelt und drei verschiedene Methoden zur Einführung der Nitrilgruppe an Posi-

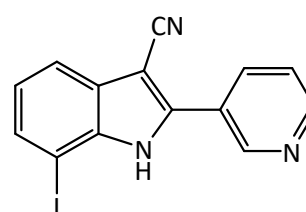
tion 3 des Indols etabliert. Für die Inhibition der DYRK1A-Aktivität erwies sich aufgrund der wasservermittelten Halogenbindung in Position 7 ein Iodsubstituent als vorteilhaft. An Position 1 war die freie NH-Gruppe essentiell und an Position 2 führte ein unsubstituierter Phenylring zu den potentesten Inhibitoren. **19f** stellt den aktivsten DYRK1A-Inhibitor (IC_{50} = 10 nM) dieser Arbeit dar, der auch in HeLa-Zellen eine submikromolare Inhibition der DYRK1A-vermittelten SF3B1-Phosphorylierung zeigte (IC_{50} = 320 nM). Es gelang allerdings nicht, eine Selektivität gegenüber den verwandten Kinasen DYRK1B und CLK1 zu erreichen.

**19f** IC_{50} DYRK1A = 10 nM

logP = 4.42

 $S_{kin., pH\ 7.4}$ = 4.57 μ M**19i** IC_{50} DYRK1A = 70 nM

logP = 4.37

 $S_{kin., pH\ 7.4}$ = 16.2 μ M**19s** IC_{50} DYRK1A = 80 nM

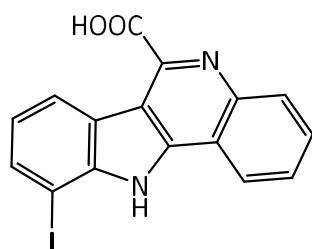
logP = 3.89

 $S_{kin., pH\ 7.4}$ = 10.0 μ M

Durch die Bestimmung der thermodynamischen und kinetischen Löslichkeit und Berechnung des logP-Wertes wurden die physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen evaluiert. Im Vergleich zu **18a** zeigte **19f** weder eine geringere Lipophilie noch eine verbesserte Löslichkeit. Durch den Austausch des 2-Phenylrings von **19f** gegen einen Pyridin-3-yl- (**19s**) oder einen Cyclopentylrest (**19i**) konnte der logP-Wert gesenkt werden. Dadurch verbesserte sich die Löslichkeit, ohne dass sich die Hemmaktivität an DYRK1A deutlich verschlechterte. Insbesondere **19i** stellt mit einem IC_{50} -Wert von 70 nM und einem hohen Anteil gesättigter Kohlenstoffatome eine interessante Ausgangsstruktur für die weitere Optimierung der Indol-3-carbonitrile als DYRK1A-Inhibitoren mit verbesserten Löslichkeitseigenschaften dar.

7 Summary

Because its overexpression is associated with mental retardation in people with Down syndrome and with the development of Alzheimer's disease, the protein kinase DYRK1A represents an interesting target for the development of new inhibitors. FALKE identified 11*H*-indolo[3,2-*c*]quinoline-6-carboxylic acids as potent inhibitors of DYRK1A with KuFal194 (**18a**) as the most potent and selective derivative. However, due to the large aromatic system this compound is very lipophilic, nearly insoluble in water and therefore not suitable for the potential use as a drug. The aim of this work was to develop new DYRK1A inhibitors with improved solubility related to KuFal194 (**18a**). By downsizing the ring system of KuFal194 the fragment **19a** was created which showed improved physicochemical properties.

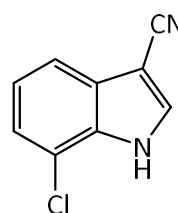


KuFal194 (18a)

IC_{50} DYRK1A = 6 nM

logP = 4.22

$S_{kin., pH 7.4}$ = 5.28 μ M



19a

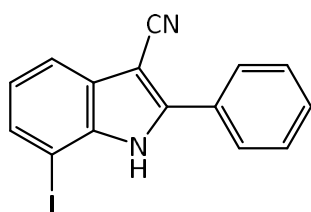
IC_{50} DYRK1A = 3300 nM

logP = 2.53

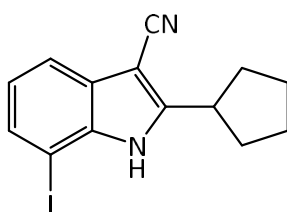
$S_{kin., pH 7.4}$ = 116 μ M

Docking studies revealed a potential binding mode in the ATP binding pocket of DYRK1A that led to possible modifications of the fragment **19a**. The halogen substituent at position 7 forms a water mediated halogen bond to the hinge region and the nitrile group interacts with the conserved Lys188. Both structural elements are essential for the orientation within the host protein and were not changed. By replacing the 7-chloro substituent with other halogens and introducing further substituents at positions 1 and 2 of the indole, new derivatives with improved potency were synthesized and structure activity relationships of the indole-3-carbonitriles were analyzed. New synthesis routes were developed based on three different methods for the introduction of the nitrile group at position 3 of the indole core. For inhibition of DYRK1A activity a 7-iodo substituent was beneficial due to the water mediated halogen bond. An unsubstituted NH group was essential and in analogy to **18a** an unsubstituted phenyl residue at position 2 led to the most potent inhibitors with **19f** repre-

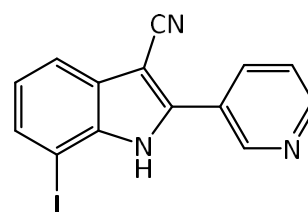
senting the derivative with the strongest DYRK1A inhibitory activity ($IC_{50} = 10$ nM). This compound also inhibited DYRK1A-mediated phosphorylation of SF3B1 in HeLa cells with submicromolar potency ($IC_{50} = 320$ nM). All compounds exhibited poor selectivity with comparable activity against the related kinases DYRK1B and CLK1.

**19f** IC_{50} DYRK1A = 10 nM

logP = 4.42

 $S_{kin., pH\ 7.4} = 4.57\ \mu M$ **19i** IC_{50} DYRK1A = 70 nM

logP = 4.37

 $S_{kin., pH\ 7.4} = 16.2\ \mu M$ **19s** IC_{50} DYRK1A = 80 nM

logP = 3.89

 $S_{kin., pH\ 7.4} = 10.0\ \mu M$

The physicochemical properties were evaluated by measuring the thermodynamic and kinetic solubility and by calculating the logP value. Compared to **18a**, **19f** displayed neither reduced lipophilicity nor improved solubility. By replacing the 2-phenyl substituent of **19f** with pyridin-3-yl (**19s**) or cyclopentyl residues (**19i**) the logP value was decreased and solubility was improved while the DYRK1A activity was only slightly diminished. Because of double digit nanomolar activity ($IC_{50} = 70$ nM) and a high fraction of saturated carbon atoms, especially **19i** represents a promising structure for further optimisation of indole-3-carbonitriles as DYRK1A inhibitors with improved solubility.

8 Experimenteller Teil

8.1 Geräte und Methoden

Chemikalien und Ausgangsstoffe

7-Chlorindol wurde von Activate Scientific (Prien, Deutschland) und 7-Bromindol wurde von Maybridge (Loughborough, Großbritannien) bezogen. Alle weiteren Ausgangsstoffe und Reagenzien wurden von Acros Organics (Geel, Belgien), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Die Ausgangsstoffe wurden ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigfolien Polygram SIL G/UV₂₅₄, Silicagel 60 (0.2 mm) auf Polyester, 40 x 80 mm, Fluoreszenzindikator, Fa. Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Die Auswertung erfolgte mit UV-Licht (254 nm) (UV Cabinet, CAMAG, Muttenz, Schweiz). Als Fließmittel wurden vorwiegend Gemische aus Petrolether und Ethylacetat in verschiedenen Zusammensetzungen gewählt.

Elementaranalytik

CE Instruments Flash EA 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest (San Jose, CA, USA). Die berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert einer Doppelbestimmung in Prozent angegeben.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), analytisch

System 1: Merck Hitachi Elite LaChrom: *diode array detector* (DAD) L-2450, Pumpe L-2130, Autosampler L-2200, Säulenofen L-2300 (Ofentemperatur: 40 °C), Organizerbox L-2000; Software: EZChrom Elite, Version 3.3.2 SP2, Fa. Hitachi High Technologies Corporation (Tokio, Japan).

System 2: Merck Hitachi Elite LaChrom: UV-Detektor L-2400, Pumpe L-2130, Autosampler L-2200, Organizerbox L-2000; Software: EZChrom Elite Version 3.3.2 SP2, Fa. Hitachi High Technologies Corporation (Tokio, Japan).

System 3: VWR Hitachi Chromaster: DAD 5430, Pumpe 5110, Autosampler 5260, Säulenofen 5310 (Ofentemperatur: 40 °C); Software: Chromaster System Manager Version 1.1, Fa. Hitachi High Technologies Corporation (Tokio, Japan).

Stationäre Phase: Säulenhalter: LiChroCART 125-4, Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm), Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland).

Probenvorbereitung: Etwa 0.5 mg der Probe wurden in 400 µL DMSO in Whatman Mini-UniPrep Vials gelöst und durch den Whatman Mini-UniPrep Filter filtriert.

Elutionsmittel: Isokratische Elution: Acetonitril-Wasser- oder Acetonitril-Puffer-Gemische verschiedener Zusammensetzungen: Triethylaminpuffer pH 2.6: Triethylamin (20 mL) und Natriumhydroxid (242 mg) wurden in bidestilliertem Wasser (980 mL) gelöst und der pH-Wert mit konz. Schwefelsäure auf 2.6 eingestellt; Phosphatpuffer pH 6.0: Kaliummonohydrogenphosphat-Trihydrat (4.587 g) wurde in bidestilliertem Wasser (1 L) gelöst und der pH-Wert mit Phosphorsäure 85 % auf 6.0 eingestellt; Phosphatpuffer pH 7.0: Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat (3.56 g) wurde in bidestilliertem Wasser (1 L) gelöst und der pH-Wert mit Phosphorsäure 85 % auf 7.0 eingestellt; Gradientenelution: Acetonitril-Wasser-Gemisch (0–2 min: 10 % ACN, 2–12 min: 10 % → 90 % ACN (linear); 12–20 min: 90 % ACN).

Elution: Injektionsvolumen: 2–10 µL, abhängig von der Konzentration der Probe, angestrebt wurde eine maximale Absorption zwischen 300 und 1500 mAU; Flussrate: 1.000 mL/min; Laufzeit: 15 min (isokratische Elution) oder 20 min (Gradientenelution).

Detektion und Auswertung: Isokratische Elution: Aufnahme des UV-Spektrums mit DAD und Auswertung bei 254 und 280 nm. Aus den Spektren wurden zusätzlich die Absorptionsmaxima (λ_{max}) im Peakmaximum abgelesen; Gradientenelution: UV-Detektion bei 254 nm; Auswertung mit der 100%-Methode nach Integration der Peakflächen (AUC 100%); Integrationsausschluss von 0–1.6 min; *threshold*: 1000 (EZChrom Elite), *sensitivity*: 50 (Chromaster); Bestimmung der Totzeit (t_m , bezogen auf DMSO) und der Bruttoretentionszeit (t_{ms}).

HPLC, präparativ

System: LaPrep P110 Preparative HPLC Pump, LaPrep P311 Spectralphotometer, LaPrep P216 Fraction Collector, Probenschleife (max. Injektionsvolumen: 5 mL), Säulenrohr 125 mm, Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland), Selbstfüllstand NW25, Fa. Merck.

Säulenmaterial: LiChrospher 100 RP-18, 12 μ M, Fa. Merck.

Probenvorbereitung: Die Probe wurde in 4 mL eines Gemisches aus DMSO und Elutionsmittel gelöst.

Elution: Injektion von 4 mL Probe und 1 mL DMSO (*sandwich*-Injektion); Flussrate: 40 mL/min, Laufzeit: 20 min.

Elutionsmittel: ACN/H₂O (bidest.)-Gemische in verschiedenen Zusammensetzungen.

Detektion: UV-Detektion bei 254 nm.

Infrarotspektrometrie

Nicolet FT-IR 200 Spektrometer, Fa. Thermo Nicolet (Madison, WI, USA). Feststoffe wurden als KBr-Presslinge und Flüssigkeiten und ölige Verbindungen auf einem NaCl-Fenster vermessen.

Kernspinresonanzspektrometrie (NMR-Spektrometrie)

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte im NMR-Labor des Instituts für Organische Chemie der TU Braunschweig.

Bruker Avance III 400 (¹H-NMR-Messung: 400 MHz; ¹³C-NMR-Messung: 101 MHz), Bruker Avance III HD 500 (¹H-NMR-Messung: 500 MHz; ¹³C-NMR-Messung: 126 MHz), Bruker Avance II 600 (¹H-NMR-Messung: 600 MHz; ¹³C-NMR-Messung: 151 MHz), Fa. Bruker (Billerica, MA, USA).

Lösungsmittel: *d*₆-DMSO.

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS); Angabe der chemischen Verschiebung in ppm in Bezug zum internen Standard ($\delta_{\text{TMS}} = 0$ ppm).

^1H -NMR: Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration. Angabe der Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, sept = Septett, m = Multiplett, dd = Dublett von Dubletts, dt = Dublett von Triplets, ddd = Dublett von Dubletts von Dubletts, ddt = Dublett von Dubletts von Triplets.

^{13}C -NMR: Aufnahme von breitbandenkoppelten Spektren; die Zuordnung der Signale erfolgte anhand von ^{13}C -DEPT135-Spektren.

Massenspektrometrie

Die Aufnahme der EI-Spektren und von hochaufgelösten Spektren (HRMS) zur Bestimmung der Präzisionsmasse erfolgte am Institut für Organische Chemie, TU Braunschweig: Finnigan-MAT 95, Fa. Thermo Finnigan (Bremen, Deutschland).

EI-MS: Ionisationsenergie 70 eV;

HRMS: Perfluorkerosin als interner Massenstandard, Hochauflösung des Signals des Molekülradikalkations $[\text{M}]^{+\bullet}$, angegeben sind die berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Massen.

APCI-MS: expression¹ CMS Spektrometer, Fa. Advion (Ithaca, NY, USA). Die Messung erfolgte im positiven Modus und durch direkte Probenzufuhr mit ASAP (*atmospheric solids analysis probe*). Einstellungen: *Source Gas Temperature:* 350 °C, *APCI Corona Discharge:* 5.0 μA , *Capillary Temperature:* 250 °C, *Capillary Voltage:* 170 V; Software: Advion Mass Express (Aufnahme der Spektren) und Advion Data Express (Auswertung), Version 3.1.21.1.

Nephelometer

NEPHELOstar^{plus}, Fa. BMG LABTECH (Ortenberg, Deutschland).

pH-Meter

632 pH-Meter mit Glaselektrode, Fa. Metrohm GmbH und Co. KG (Filderstadt, Deutschland).

Schmelzpunktbestimmung

Digitales Schmelzpunktbestimmungsgerät Electrothermal IA 9100, Fa. Cole-Parmer (Stone, Großbritannien). Der Schmelzpunkt (Smp.) wurde in einseitig geschlossenen Glaskapillaren bestimmt. Wurde eine Zersetzung beobachtet, ist dies durch den Zusatz Zers. gekennzeichnet.

Schüttelinkubator

IKA KS 3000 ic control mit separatem Kühler KV 600 digital – 230 V, Fa. IKA-Werke (Staufen, Deutschland).

Waagen

Mikrowaage Sartorius MC 5, Analysenwaage Sartorius BP 161 P und Präzisionswaage Sartorius BP 2100 S, Fa. Sartorius (Göttingen, Deutschland).

8.1.1 Lösungsmittel

Wenn nicht anders angegeben, wurden ungetrocknete Lösemittel verwendet. Dimethylformamid wurde immer in der käuflich erhältlichen Uvasol-Qualität verwendet. Die Trocknung der Lösungsmittel erfolgte angelehnt an publizierte Methoden¹³⁵:

Acetonitril:

1 L Acetonitril wurde für 24 h über 50 g Phosphorpentoxid gerührt. Anschließend wurde für 2 h zum Rückfluss erhitzt, destilliert und über Molekularsieb (3 Å) aufbewahrt.

Dichlorethan: 1 L Dichlorethan wurde mit wasserfreiem Phosphorpentoxid (25 g) versetzt und 2 Tage stehen gelassen. Nach dem Dekantieren wurde das Lösemittel mit neuem Phosphorpentoxid (15 g) 1 h refluxiert, anschließend destilliert und über Molekularsieb (3 Å) gelagert.

Dichlormethan: 1 L Dichlormethan wurde über Nacht über 20 g Kaliumhydroxid vorgetrocknet. Anschließend wurde das KOH abfiltriert und das Lösemittel über 2 g Calciumhydrid unter Feuchtigkeitsausschluss für 4 h zum Rückfluss erhitzt, im Anschluss destilliert und über Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt.

Diethylether: 1 L des Ethers wurde zunächst auf Peroxide getestet und über Nacht über 20 g Kaliumhydroxid vorgetrocknet. Anschließend wurde KOH abfiltriert und der Diethylether

über 2 g Calciumhydrid unter Feuchtigkeitsausschluss für 4 h zum Rückfluss erhitzt, im Anschluss destilliert und über Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt.

Pyridin: 500 mL Pyridin wurden für 24 h über 20 g Kaliumhydroxid getrocknet und anschließend über Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt.

Tetrahydrofuran: 1 L Tetrahydrofuran wurde zunächst auf Peroxide getestet und über Nacht über 10 g Natrium vorgetrocknet. Anschließend wurde das THF abdekantiert und in einem mit Stickstoff gespülten Kolben über 10 g Natrium unter Feuchtigkeitsausschluss zum Rückfluss erhitzt bis die Lösung durch den Zusatz von 2 g Benzophenon blau gefärbt wurde. Im Anschluss wurde destilliert und über Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt.

Toluen: 1 L Toluol wurde zunächst im Rundkolben mit Wasserabscheider unter Feuchtigkeitsausschluss zum Rückfluss erhitzt. Das Kondensat im Wasserabscheider wurde solange abgelassen bis es nicht mehr getrübt war. Nach dem Abkühlen wurde Calciumchlorid (15 g) hinzugefügt und der Wasserabscheider entfernt. Es wurde 3 Stunden zum Rückfluss erhitzt, anschließend destilliert und über Molekularsieb (4 Å) gelagert.

8.2 Synthesen und analytische Daten

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) 1: Synthese der Indol-3-carbonitrile (Methode A)

Die entsprechende 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (**36**, 1 Äquivalent), Natriumacetat (2 Äquivalente) und Hydroxylamin-Hydrochlorid (2 Äquivalente) werden in dem angegebenen Volumen eines Ethanol-Wasser-Gemisches gelöst und 6–9 h zum Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wird dünnschichtchromatographisch überwacht. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit dem angegebenen Fließmittel säulenchromatographisch aufgereinigt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie in den einzelnen Synthesevorschriften angegeben.

AAV 2: Synthese der Indol-3-carbonitrile (Methode B)

Das entsprechende Indol (**29** oder **35**, 1 Äquivalent) und NCTS (**37**, 1 Äquivalent) werden in einem zuvor mit Argon gespülten Mikrowellenreaktionsgefäß in getrocknetem Dichlorethan (1 mL) gelöst. Nach der Zugabe von Bortrifluorid-diethyletherat (1–4 Äquivalente) wird das Gefäß verschlossen und für die angegebene Zeit in einem auf 100 °C temperierten Ölbad erhitzt. Anschließend wird die Lösung mit Dichlorethan (10 mL) verdünnt und nacheinander mit jeweils 10 mL verdünnter Natriumhydroxid-Lösung (w = 8.5 %), verdünnter Salzsäure (w

= 7.3 %) und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgt wie in den Synthesvorschriften der einzelnen Verbindungen angegeben.

AAV 3: Synthese der Indol-3-carbonitrile (Methode C)

Das entsprechende Indol (**29**, 1 Äquivalent) wird unter Stickstoffatmosphäre in dem angegebenen Volumen an getrocknetem Acetonitril gelöst. Die Lösung wird im Eisbad auf 0 °C gekühlt und langsam eine Mischung aus Chlorsulfonylisocyanat (**38**, 1–7 Äquivalente) und wasserfreiem ACN (5 mL) hinzugefügt. Die Kühlung wird entfernt und die Lösung bei Raumtemperatur für vier Stunden gerührt. Anschließend wird eine Mischung aus DMF (1 mL) und wasserfreiem ACN (5 mL) hinzugegeben und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser (30 mL) beendet und der Ansatz mit Ethylacetat extrahiert (3x30 mL). Die organischen Phasen werden vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgt wie in den Synthesvorschriften der einzelnen Verbindungen angegeben.

AAV 4: Synthese der *N*-methylierten Verbindungen **20** und **35**

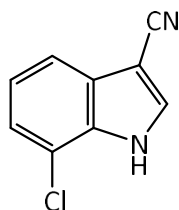
Zunächst wird unter N₂-Atmosphäre und Eiskühlung eine Suspension aus Natriumhydrid (5–10 Äquivalente) in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL) hergestellt. Anschließend wird das entsprechende Indol-3-carbonitril **19** oder das Indol **29** (1 Äquivalent) hinzugefügt. Es wird 15 min bei Eiskühlung und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz wieder auf 0 °C abgekühlt und Iodmethan (1.2 Äquivalente) hinzuge tropft und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Beenden der Reaktion wird vorsichtig Wasser (10 mL) zugesetzt, der Ansatz in einen Scheidetrichter überführt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (3x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt wie in der jeweiligen Synthesvorschrift angegeben.

AAV 5: Synthese der 2-substituierten Indole **29**

Das entsprechende 1-(2-Aminophenyl)-2-chlorethanon (**24**, 1 Äquivalent) wird unter Stickstoffatmosphäre in dem angegebenen Lösemittel gelöst und auf -10°C abgekühlt. Das entsprechende Grignard-Reagenz (**28**, 2.5 Äquivalente) wird langsam hinzutropft, wobei die Temperatur unter 10 °C gehalten wird. Nach der vollständigen Zugabe wird für 15 min bei 0 °C und für 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie in den Synthesevorschriften der einzelnen Verbindungen angegeben.

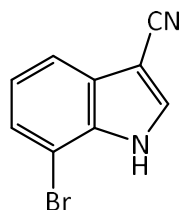
AAV 6: Synthese der 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoessigsäuren **36**

Das entsprechende Indol (**29** oder **34**, 1 Äquivalent) wird in dem angegebenen Volumen von getrocknetem Diethylether gelöst und anschließend Oxalylchlorid (20 Äquivalente) hinzugegeben. Unter Feuchtigkeitsausschluss wird für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt wie in den einzelnen Synthesevorschriften angegeben.

7-Chlor-1*H*-indol-3-carbonitril (19a)

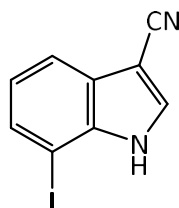
Nach AAV 1 aus 2-(7-Chlor-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (**36a**, 87 mg, 0.389 mmol), Hydroxylamin-Hydrochlorid (63 mg, 0.907 mmol) und Natriumacetat (74 mg, 0.902 mmol) in Ethanol (5 mL) und Wasser (2 mL). Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Fließmittel: Toluol-Ethylacetat-Ameisensäure 10:1:1) aufgereinigt und anschließend aus *n*-Hexan umkristallisiert. Es wurden 34 mg (49 %) eines gelblichen Pulvers erhalten.

Smp.: 179–180 °C (Lit.¹³⁶: 180–181 °C); IR (KBr): 3256 cm⁻¹ (NH), 2220 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.26 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, H-5), 7.40 (dd, 1H, *J* = 7.7/0.9 Hz, H-6), 7.64 (dd, 1H, *J* = 7.9/0.9 Hz, H-4), 8.37 (s, 1H, H-2), 12.68 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 117.5, 122.8, 123.0, 135.8 (CH), 85.7, 115.6, 117.3, 128.5, 132.3 (C); C₉H₅ClN₂ (176.60); HPLC (isokr.): 98.7 % bei 254 nm und 99.7 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 3.2 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 50:50) (System 1); HPLC (Gradient): 96.1 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 10.6 min, *t*_m = 1.3 min (System 2); λ_{max}: 274 nm.

7-Brom-1*H*-indol-3-carbonitril (**19b**)

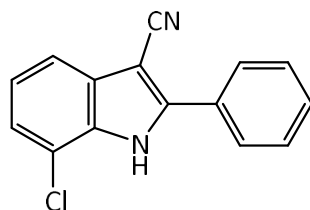
Nach AAV 1 aus 2-(7-Brom-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (**36b**, 135 mg, 0.504 mmol), Hydroxylamin-Hydrochlorid (69 mg, 0.993 mmol) und Natriumacetat (82 mg, 1.000 mmol) in Ethanol (8 mL) und Wasser (3 mL). Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 8:2) aufgereinigt und anschließend aus *n*-Hexan-Ethanol 20:1 umkristallisiert. Es wurden 50 mg (45 %) eines gelblichen Pulvers erhalten.

Smp.: 148–151 °C; IR (KBr): 3272 cm⁻¹ (NH), 2219 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 399.8 MHz): δ (ppm) = 7.19 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.53 (dd, 1H, *J* = 7.8/0.9 Hz, H-6), 7.67 (dd, 1H, *J* = 8.0/0.9 Hz, H-4), 8.35 (s, 1H, H-2), 12.50 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.5 MHz): δ (ppm) = 118.0, 123.1, 126.1, 135.7 (CH), 85.8, 105.3, 115.6, 128.2, 133.7 (C); C₉H₅BrN₂ (221.06); CHN: ber. C 48.90, H 2.28, N 12.67; gef. C 48.79, H 2.02, N 12.44; MS (EI): *m/z* (%) = 220 [M]⁺ (100), 141 [M⁺-79] (48); HPLC (isokr.): 98.7 % bei 254 nm und 99.6 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 3.5 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 50:50) (System 1); HPLC (Gradient): 98.5 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 10.77 min, *t*_m = 1.3 min (System 2); λ_{max}: 275 nm.

7-Iod-1*H*-indol-3-carbonitril (19c)

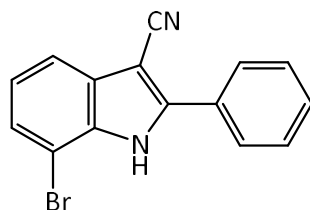
Nach AAV1 aus 2-(7-Iod-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (**36c**, 181 mg, 0.575 mmol), Hydroxylamin-Hydrochlorid (79 mg, 1.137 mmol) und Natriumacetat (94 mg, 1.146 mmol) in Ethanol (15 mL) und Wasser (3 mL). Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 9:1) aufgereinigt und anschließend aus *n*-Hexan – Ethanol 10:1 umkristallisiert. Es wurden 58 mg (38 %) weiß-bräunliche Kristalle erhalten.

Smp.: 161–163 °C; IR (KBr): 3233 cm⁻¹ (NH), 2229 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.05 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.66 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H-4/H-6), 7.70 (dd, 1H, *J* = 7.5/0.9 Hz, H-4/H-6), 8.30 (s, 1H, H-2), 12.21 (s, 1H, NH) ; ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 118.5, 123.5, 132.5, 135.3 (CH), 78.2, 85.9, 115.9, 127.1, 137.2 (C); C₉H₅IN₂ (268.06); CHN: ber. C 40.33, H 1.88, N 10.45; gef. C 40.45, H 1.65, N 10.11; MS (EI): *m/z* (%) = 268 [M]⁺ (100), 141 [M⁺-127] (34); HPLC (isokr.): 99.4 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 4.1 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 50:50) (System 1); HPLC (Gradient): 100.0 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 11.1 min, *t*_m = 1.3 min (System 2); λ_{max}: 274 nm.

7-Chlor-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (**19d**)

Nach AAV 2 aus 7-Chlor-2-phenyl-1*H*-indol (**29a**, 154 mg, 0.659 mmol), NCTS (**37**, 179 mg, 0.661 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (0.20 mL, 1.58 mmol). Es wurde 44 Stunden erhitzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Dichlormethan 1:2) aufgereinigt. Nach anschließender Umkristallisation aus Ethylacetat-*n*-Hexan 34:100 wurden 31 mg (19 %) eines farblosen Pulvers erhalten.

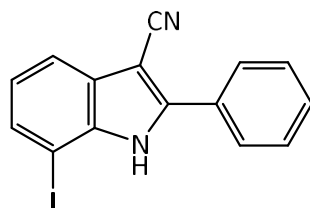
Smp.: 266–268 °C; IR (KBr): 3209 cm⁻¹ (NH), 2200 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.28 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.42 (dd, 1H, *J* = 7.7/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.62 (m, 4H, ArH), 7.98 (m, 2H, ArH), 12.77 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 117.4, 123.1, 123.6, 128.1 (2C), 129.0 (2C), 130.3 (CH), 83.3, 116.2, 117.1, 128.7, 129.8, 132.7, 146.9 (C); C₁₅H₉ClN₂ (252.70); CHN: ber. C 71.30, H 3.59, N 11.09, gef. C 71.21, H 3.45, N 10.81 (Einfachbestimmung); MS (EI): *m/z* (%) = 252 [M]⁺ (100), 217 [M⁺-35] (9); HPLC (isokr.): 98.3 % bei 254 nm und 99.3 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 4.6 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 60:40) (System 1); HPLC (Gradient): 98.7 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 12.8 min, *t*_m = 1.2 min (System 2); λ_{max}: 243 und 303 nm.

7-Brom-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (19e)

7-Brom-2-phenyl-1*H*-indol (**29b**, 203 mg, 0.746 mmol) und NCTS (**37**, 204 mg, 0.749 mmol) wurden in einem zuvor mit Argon gespülten Kolben in getrocknetem Toluol (1.0 mL) gelöst. Nach der Zugabe von Bortrifluoriddiethyletherat (200 µl, 1.58 mmol) wurde der Ansatz für 10 Stunden zum Rückfluss erhitzt.

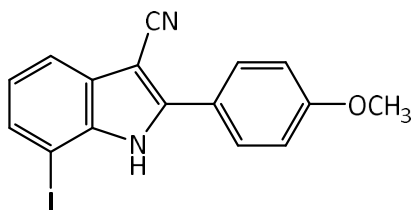
Anschließend wurde die Suspension mit Toluol (5 mL) verdünnt und der entstandene Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde nacheinander mit verdünnter Natriumhydroxid-Lösung (5 mL), verdünnter Salzsäure (5 mL) und Wasser (5 mL) gewaschen. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zusammen mit dem abfiltrierten Feststoff aus Methanol (20 mL) umkristallisiert. Es wurden 30 mg (14 %) eines grauen Pulvers erhalten.

Smp.: 248–251 °C; IR (KBr): 3206 cm⁻¹ (NH), 2219 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.22 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.56 (dd, 1H, *J* = 7.7/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.57 – 7.65 (m, 3H, ArH), 7.67 (dd, 1H, *J* = 7.9/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.95 – 7.99 (m, 2H, ArH), 12.62 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 117.9, 123.5, 126.8, 128.4 (2C), 128.9 (2C), 130.3 (CH), 83.6, 105.1, 116.3, 128.7, 129.6, 134.3, 147.1 (C); C₁₅H₉BrN₂ (297.16); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 295.99436, gef. 295.99512; HPLC (isokr.): 99.0 % bei 254 nm und 99.7 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 4.8 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 60:40) (System 1); HPLC (Gradient): 98.1 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 13.0 min, *t*_m = 1.2 min (System 2); λ_{max}: 242 und 303 nm.

7-Iod-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (**19f**)

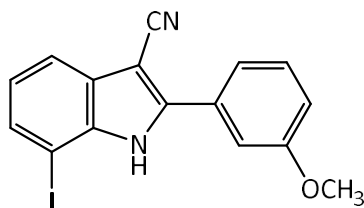
Nach AAV 2 aus 7-Iod-2-phenyl-1*H*-indol (**29c**, 123 mg, 0.385 mmol), NCTS (**37**, 105 mg, 0.386 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (0.10 mL, 0.79 mmol). Es wurde 46 Stunden erhitzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 5:1) aufgereinigt. Nach anschließender Umkristallisation aus Methanol wurden 40 mg (30 %) feine, farblose Kristalle erhalten.

Smp.: 223–224 °C; IR (KBr): 3192 cm⁻¹ (NH), 2221 cm⁻¹ (C≡N)); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.07 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, H-5), 7.55 – 7.65 (m, 3H, ArH), 7.67 (dd, 1H, *J* = 7.9/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.74 (dd, 1H, *J* = 7.5/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.90 – 7.96 (m, 2H, ArH), 12.32 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 118.4, 123.8, 128.54 (2C), 128.82 (2C), 130.2, 133.4 (CH), 77.7, 83.8, 116.4, 128.47, 128.77, 137.8, 146.9 (C); C₁₅H₉IN₂ (344.16); CHN: ber. C 52.35, H 2.64, N 8.14, gef. C 52.39, H 2.49, N 7.97; MS (EI): *m/z* (%) = 344 [M]⁺⁺ (100), 217 [M⁺⁺-127] (22); HPLC (isokr.): 99.8 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 5.9 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 60:40) (System 1); HPLC (Gradient): 99.1 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 13.3 min, *t*_m = 1.2 min (System 2); λ_{max}: 242 und 304 nm.

7-Iod-2-(4-methoxyphenyl)-1*H*-indol-3-carbonitril (**19g**)

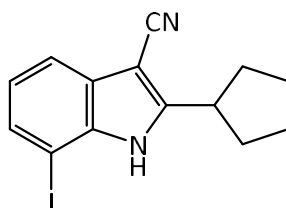
Nach AAV 2 aus 7-Iod-2-(4-methoxyphenyl)-1*H*-indol (**29j**, 79 mg, 0.225 mmol), NCTS (**37**, 63 mg, 0.23 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (50 μ L, 0.40 mmol). Es wurde 30 Stunden erhitzt. Während der Reaktion fiel ein Feststoff aus, der vor dem Waschvorgang abfiltriert wurde. Der nach dem Waschen erhaltene Rückstand wurde zusammen mit dem abfiltrierten Feststoff zweimal aus Methanol umkristallisiert. Es wurden 12 mg (14 %) eines rötlichen Feststoffs erhalten.

Smp.: 229–230 °C; IR (KBr): 3198 cm^{-1} (NH), 2219 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 3.87 (s, 3H, CH₃), 7.04 (t, 1H, J = 7.6 Hz, H-5), 7.14 – 7.20 (m, 2H, ArH), 7.62 (dd, 1H, J = 7.9/1.0 Hz, H-4/H-6), 7.70 (dd, 1H, J = 7.5/1.0 Hz, H-4/H-6), 7.88 – 7.94 (m, 2H, ArH), 12.15 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.5 (CH₃), 114.3 (2C), 118.1, 123.7, 130.0 (2C), 133.1 (CH), 77.5, 85.8, 116.7, 121.1, 128.6, 137.6, 146.9, 160.8 (C); C₁₆H₁₁IN₂O (374.18); CHN: ber. C 51.36, H 2.96, N 7.49, gef. C 51.57, H 2.95, N 7.19; MS (EI): m/z (%) = 374 [$\text{M}]^{+}$ (100), 359 [M^{+} -15] (23); HPLC (isokr.): 99.2 % bei 254 nm und 99.7 % bei 280 nm, t_{ms} = 3.6 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/H₂O 70:30) (System 1); HPLC (Gradient): 99.3 % bei 254 nm, t_{ms} = 13.5 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 221 und 277 nm.

7-Iod-2-(3-methoxyphenyl)-1*H*-indol-3-carbonitril (**19h**)

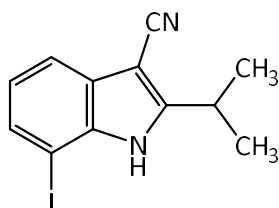
Nach AAV 2 aus 7-Iod-2-(3-methoxyphenyl)-1*H*-indol (**29k**, 155 mg, 0.444 mmol), NCTS (**37**, 121 mg, 0.444 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (200 μ L, 1.58 mmol). Es wurde 24 Stunden erhitzt. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurde der Rückstand aus Methanol umkristallisiert und heiß filtriert. Es wurden 31 mg (19 %) eines beigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 199–201 °C; IR (KBr): 3234 cm^{-1} (NH), 2214 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 3.88 (s, 3H, CH₃), 7.06 (t, 1H, J = 7.7 Hz, ArH), 7.11 – 7.19 (m, 1H, ArH), 7.45 – 7.60 (m, 3H, ArH), 7.61 – 7.71 (m, 1H, ArH), 7.74 (dd, 1H, J = 7.5/1.0 Hz, ArH), 12.27 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.4 (CH₃), 114.0, 115.8, 118.4, 120.7, 123.7, 130.1, 133.5 (CH), 77.7, 83.9, 116.4, 128.5, 129.9, 137.7, 146.5, 159.3 (C); C₁₆H₁₁IN₂O (374.18); CHN: ber. C 51.36, H 2.96, N 7.49, gef. C 51.57, H 2.75, N 7.15 (Einfachbestimmung); MS (APCI): m/z (%) = 375 [M+H]⁺ (100), 248 [M-126]⁺ (31); HPLC (isokr.): 99.5 % bei 254 nm und 99.8 % bei 280 nm, t_{ms} = 3.6 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/H₂O 70:30) (System 3); HPLC (Gradient): 95.1 % bei 254 nm, t_{ms} = 12.7 min, t_{m} = 1.2 min (System 3); λ_{max} : 236 und 306 nm.

2-Cyclopentyl-7-iod-1*H*-indol-3-carbonitril (**19i**)

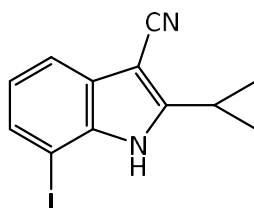
Nach AAV 2 aus 2-Cyclopentyl-7-iod-1*H*-indol (**29n**, 107 mg, 0.344 mmol), NCTS (**37**, 94 mg, 0.345 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (100 μ L, 0.789 mmol). Es wurde 42 Stunden erhitzt. Nach Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand aus Methanol umkristallisiert. Es wurden 35 mg (30 %) eines braunen Pulvers erhalten.

Smp.: 131–132 °C; IR (KBr): 3267 cm^{-1} (NH), 2964, 2865 cm^{-1} (aliph. C-H), 2210 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.60 – 1.75 (m, 2H, CH₂), 1.75 – 2.05 (m, 4H, 2xCH₂), 2.05 – 2.15 (m, 2H, CH₂), 3.42 (tt, 1H, J = 9.9/7.9 Hz, CH), 6.98 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-5), 7.53 (dt, 1H, J = 7.9/0.8 Hz, Ar-H), 7.62 (dd, 1H, J = 7.5/0.9 Hz, Ar-H), 11.86 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 25.4 (2C), 32.8 (2C) (CH₂), 38.5, 117.7, 123.2, 132.1 (CH), 77.2, 82.4, 116.1, 128.0, 136.7, 154.5 (C); C₁₄H₁₃IN₂ (336.18); CHN: ber. C 50.02, H 3.90, N 8.33, gef. C 50.08, H 3.61, N 8.11; MS (APCI): m/z (%) = 337 [M+H]⁺ (100); HPLC (isokr.): 97.4 % bei 254 nm und 99.2 % bei 280 nm, t_{ms} = 5.1 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/H₂O 65:35) (System 1); HPLC (Gradient): 96.8 % bei 254 nm, t_{ms} = 13.7 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} 282 nm.

7-Iod-2-isopropyl-1*H*-indol-3-carbonitril (**19j**)

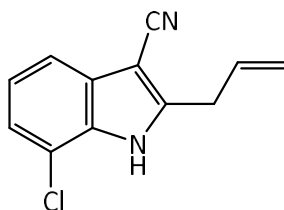
Nach AAV 3 aus 7-Iod-2-isopropyl-1*H*-indol (**29i**, 172 mg, 0.603 mmol) und Chlorsulfonylisocyanat (**38**, 250 μ L, 2.87 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 4:1). Es wurden 58 mg (31 %) eines hellgelben kristallinen Pulvers erhalten.

Smp.: 175–176 °C; IR (KBr): 3214 cm^{-1} (NH), 2967, 2929, 2872 cm^{-1} (aliph. C-H), 2219 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.42 (d, 6H, J = 7.0 Hz, 2xCH $_3$), 3.40 (hept, 1H, J = 7.0 Hz, CH), 6.98 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-5), 7.54 (dt, 1H, J = 7.9/0.8 Hz, Ar-H), 7.63 (dd, 1H, J = 7.5/1.0 Hz, Ar-H), 11.83 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.6 (2C) (CH $_3$), 27.7, 117.8, 123.3, 132.1 (CH), 77.3, 81.8, 116.1, 127.9, 136.6, 156.3 (C); C $_{12}$ H $_{11}$ IN $_2$ (310.14); HRMS (EI): m/z [M] $^{+\bullet}$ ber. 309.99614, gef. 309.99563; MS (EI): m/z (%) = 310 [M] $^{+\bullet}$ (62), 295 [M $^{+\bullet}$ -15] (100), 168 [M $^{+\bullet}$ -142] (28); HPLC (isokr.): 99.5 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, t_{ms} = 4.7 min, t_{m} = 1.3 min (ACN/H $_2$ O 60:40) (System 3); HPLC (Gradient): 98.5 % bei 254 nm, t_{ms} = 12.1 min, t_{m} = 1.2 min (System 3); λ_{max} : 276 nm.

2-Cyclopropyl-7-iod-1*H*-indol-3-carbonitril (**19k**)

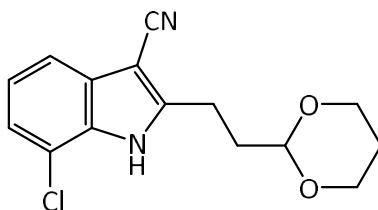
Nach AAV 3 aus 2-Cyclopropyl-7-iod-1*H*-indol (**29m**, 194 mg, 0.685 mmol) und Chlorsulfonyl-isocyanat (**38**, 300 μ L, 3.45 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 2:1). Es wurden 25 mg (12 %) eines bräunlichen Pulvers erhalten.

Smp.: 157–160 °C; IR (KBr): 3236 cm^{-1} (NH), 2215 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.16 – 1.20 (m, 2H, CH₂), 1.21 – 1.27 (m, 2H, CH₂), 2.30 (tt, 1H, J = 8.6/5.3 Hz, CH), 6.96 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-5), 7.48 (dt, 1H, J = 7.9/0.8 Hz, H-4/H-6), 7.60 (dd, 1H, J = 7.6/1.0 Hz, H-4/H-6), 11.85 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 8.8 (2C) (CH₂), 9.3, 117.4, 123.3, 132.0 (CH), 76.9, 81.3, 116.0, 128.0, 136.7, 152.4 (C); C₁₂H₉IN₂ (308.12); HRMS (EI): m/z [M]⁺• ber. 307.98049, gef. 307.98031; MS (EI): m/z (%) = 308 [M]⁺• (100), 281 [M]⁺•-27] (20), 181 [M]⁺•-127] (45), 154 [M]⁺•-154] (36); HPLC (isokr.): 99.8 % bei 254 nm und 99.1 % bei 280 nm, t_{ms} = 4.0 min, t_{m} = 0.9 min (ACN/H₂O 60:40) (System 3); HPLC (Gradient): 98.7 % bei 254 nm, t_{ms} = 11.7 min, t_{m} = 1.0 min (System 3); λ_{max} : 284 nm.

2-Allyl-7-chlor-1*H*-indol-3-carbonitril (19l)

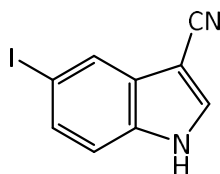
Nach AAV 1 aus Natriumacetat (152 mg, 1.85 mmol), Hydroxylamin-Hydrochlorid (129 mg, 1.86 mmol) und 2-(2-Allyl-7-chlor-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (**36d**, 245 mg, 0.929 mmol) in Wasser (5 mL) und Ethanol (10 mL). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 2:1) und anschließend aus *n*-Hexan-Ethylacetat (20:1) umkristallisiert. Zur analytischen Aufreinigung wurde der Feststoff nochmals säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: *n*-Hexan-Ethylacetat 3:1). Es wurden 72 mg (36 %) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 121–123 °C; IR (KBr): 3214 cm⁻¹ (NH), 2220 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 3.70 (dt, 2H, *J* = 6.4/1.5 Hz, CH₂ gesättigt), 5.06 – 5.25 (m, 2H, CH₂, ungesättigt), 6.04 (ddt, 1H, *J* = 16.7/10.2/6.5 Hz, Allyl-CH), 7.17 – 7.23 (m, 1H, ArH), 7.33 (dd, 1H, *J* = 7.7/0.9 Hz, ArH), 7.53 (dt, 1H, *J* = 7.7/0.8 Hz, ArH), 12.51 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.1, 117.8 (CH₂), 117.0, 122.6, 122.7, 133.3 (CH), 84.1, 115.4, 116.6, 129.0, 131.8, 148.6 (C); C₁₂H₉ClN₂ (216.67); CHN: ber. C 66.52, H 4.19, N 12.93, gef. C 66.48, H 4.07, N 12.61 (Einfachbestimmung); MS (APCI): *m/z* (%) = 217 [M+H]⁺ (100), 190 [M-26]⁺ (100), 189 [M-27]⁺ (50); HPLC (isokr.): 94.8 % bei 254 nm und 98.9 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 5.6 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 50:50) (System 3); HPLC (Gradient): 95.0 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 11.2 min, *t*_m = 1.2 min (System 3); λ_{max}: 279 nm.

7-Chlor-2-(2-(1,3-dioxan-2-yl)ethyl)-1*H*-indol-3-carbonitril (**19m**)

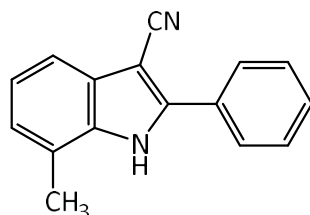
Nach AAV 1 aus Natriumacetat (60 mg, 0.73 mmol), Hydroxylamin-Hydrochlorid (53 mg, 0.76 mmol) und 7-Chlor-2-(2-(1,3-Dioxan-2-yl)ethyl)-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (**36e**, 120 mg, 0.357 mmol) in Wasser (5 mL) und Ethanol (10 mL). Der Rückstand wurde säulen-chromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 5:1). Es wurden 42 mg (44 %) eines gelb-orangen Pulvers erhalten.

Smp.: 118–120 °C; IR (KBr): 3212 cm^{-1} (NH), 2955, 2851 cm^{-1} (CH gesättigt), 2229 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.35 (dt, 1H, J = 13.4/2.7/1.4 Hz), 1.89 (dt, 1H, J = 13.4/12.4/5.0 Hz), 1.94 – 2.03 (m, 2H), 2.93 – 3.03 (m, 2H), 3.66 – 3.78 (m, 2H), 4.01 (ddt, 2H, J = 10.3/5.0/1.4 Hz), 4.56 (t, 1H, J = 5.0 Hz, CH gesättigt), 7.19 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-5), 7.31 (dd, 1H, J = 7.7/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.51 (dd, 1H, J = 8.0/1.0 Hz, H-4/H-6), 12.42 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.6, 25.3, 33.9, 66.1 (2C) (CH₂), 100.1, 116.9, 122.4, 122.6 (CH), 84.1, 115.6, 116.5, 128.9, 131.9, 150.8 (C); C₁₅H₁₆ClN₂O₂ (290.75); CHN: ber. C 61.97, H 5.20, N 9.64, gef. C 62.26, H 4.90, N 9.24 (Einfachbestimmung); MS (EI): m/z (%) = 290 [M]⁺ (69), 231 [M^{+} -59] (48), 216 [M^{+} -74] (51), 203 [M^{+} -87] (100), 189 [M^{+} -101] (50), 114 [M^{+} -176] (68), 87 [M^{+} -203] (30); HPLC (isokr.): 99.7 % bei 254 nm und 99.9 % bei 280 nm, t_{ms} = 3.9 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/H₂O 50:50) (System 1); HPLC (Gradient): 98.7 % bei 254 nm, t_{ms} = 11.6 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 278 nm.

5-Iod-1*H*-indol-3-carbonitril (**19n**)

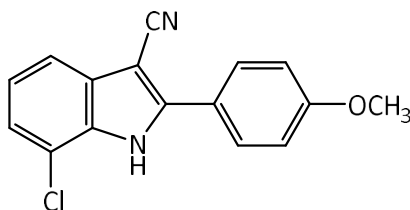
Nach AAV 1 aus Natriumacetat (129 mg, 1.57 mmol), Hydroxylamin-Hydrochlorid (109 mg, 1.57 mmol) und 2-(5-Iod-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (**36f**, 246 mg, 0.781 mmol) in Wasser (3 mL) und Ethanol (30 mL). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 1:1) und anschließend aus Toluol (4 mL) umkristallisiert und heiß filtriert. Um eine ausreichende Reinheit für die biologische Testung zu erhalten, wurde die Substanz mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Fließmittel: Acetonitril-Wasser 50:50). Es wurden 12 mg (6 %) eines beigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 189–192 °C; IR (KBr): 3312 cm⁻¹ (NH), 2211 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.41 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H-7), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8.6/1.7 Hz, H-6), 7.96 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H-4), 8.26 (s, 1H, H-2), 12.35 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 115.3, 126.7, 131.6, 135.4 (CH), 83.5, 85.9, 115.7, 129.1, 134.4 (C); C₉H₅IN₂ (267.95); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺⁺ ber. 267.94919, gef. 267.94912; MS (EI): *m/z* (%) = 268 [M]⁺⁺ (100), 141 [M⁺⁺-127] (52), 114 [M⁺⁺-154] (21); HPLC (isokr.): 99.8 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 4.1 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 50:50) (System 3); HPLC (Gradient): 99.8 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 10.6 min, *t*_m = 1.2 min (System 3); λ_{max}: 278 nm.

7-Methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (19o)

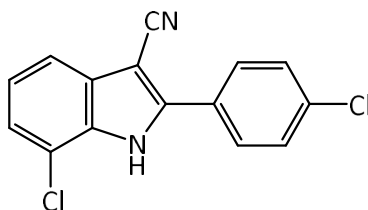
Nach AAV 2 aus 7-Methyl-2-phenyl-1*H*-indol (**29d**, 300 mg, 1.45 mmol), NCTS (**37**, 394 mg, 1.45 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (400 μ L, 3.16 mmol). Es wurde 24 Stunden erhitzt. Während der Reaktion bildete sich ein Feststoff, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde verworfen und der Feststoff aus Methanol umkristallisiert. Es wurden 164 mg (71 %) eines weißen Pulvers erhalten.

Schmp.: 285–286 °C; IR (KBr): 3442 cm^{-1} (NH), 2226 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 2.58 (s, 3H, CH₃), 7.09 – 7.14 (m, 1H, ArH), 7.14 – 7.20 (m, 1H, ArH), 7.47 (dd, 1H, J = 7.8/1.0 Hz, H-4/H-6), 7.50 – 7.75 (m, 3H, ArH), 7.94 – 8.03 (m, 2H, ArH), 12.22 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 16.9 (CH₃), 115.8, 122.2, 124.5, 127.7 (2C), 129.1 (2C), 129.9 (CH), 82.2, 117.0, 122.5, 128.0, 129.4, 135.1, 145.2 (C); C₁₆H₁₂N₂ (232.29); CHN: ber. C 82.73, H 5.21, N 12.06, gef. C 82.50, H 4.97, N 11.87; MS (EI): m/z (%) = 232 [$\text{M}]^{+\bullet}$ (100), 116 [$\text{M}^{+\bullet}$ -116] (6); HPLC (isokr.): 99.9 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, t_{ms} = 4.0 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/H₂O 60:40) (System 3); HPLC (Gradient): 99.7 % bei 254 nm, t_{ms} = 12.5 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 306 nm.

7-Chlor-2-(4-methoxyphenyl)-1*H*-indol-3-carbonitril (19p)

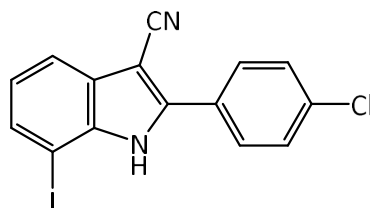
Nach AAV 2 aus 7-Chlor-2-(4-methoxyphenyl)-1*H*-indol (**29f**, 174 mg, 0.675 mmol), NCTS (**37**, 184 mg, 0.672 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (0.10 mL, 0.79 mmol). Es wurde 46 h erhitzt. Bei den Waschvorgängen bildete sich jeweils ein Feststoff, der abfiltriert wurde. Dieser Feststoff wurde zusammen mit dem erhaltenen Rückstand aus Methanol umkristallisiert. Es wurden 98 mg (52 %) eines schwach bräunlichen Pulvers erhalten.

Smp.: 255–257 °C; IR (KBr): 3204 cm⁻¹ (NH), 2218 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 3.87 (s, 3H, CH₃), 7.15 – 7.22 (m, 2H, ArH), 7.25 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.38 (dd, 1H, *J* = 7.7/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.59 (dd, 1H, *J* = 7.9/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.93 – 8.22 (m, 2H, ArH), 12.61 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.5 (CH₃), 114.5 (2C), 116.9, 123.0, 123.3, 129.7 (2C) (CH), 82.2, 116.6, 117.1, 121.1, 130.0, 132.6, 147.1, 160.9 (C); C₁₆H₁₁ClN₂O (282.73); CHN: ber. C 67.97, H 3.92, N 9.91, gef. C 68.04, H 3.70, N 9.65; MS (EI): *m/z* (%) = 282 [M]⁺⁺ (100), 267 [M⁺⁺-15] (36); HPLC (isokr.): 99.9 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 4.7 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 60:40) (System 1); HPLC (Gradient): 99.6 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 12.9 min, *t*_m = 1.2 min (System 2); λ_{max}: 256 und 310 nm.

7-Chlor-2-(4-chlorphenyl)-1*H*-indol-3-carbonitril (**19q**)

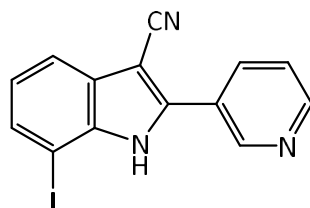
Nach AAV 2 aus 7-Chlor-2-(4-chlorphenyl)-1*H*-indol (**29e**, 152 mg, 0.580 mmol), NCTS (**37**, 160 mg, 0.588 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (0.10 mL, 0.789 mmol). Es wurde für 46 Stunden erhitzt. Bei jedem Waschvorgang bildete sich ein Feststoff, der abfiltriert wurde. Die übrige organische Phase wurde anschließend verworfen. Der Feststoff wurde aus Methanol-Toluen 6:1 umkristallisiert. Es wurden 49 mg (29 %) eines farblosen, watteartigen Feststoffs erhalten.

Smp.: 306–308 °C; IR (KBr): 3221 cm⁻¹ (NH), 2216 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.29 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.43 (dd, 1H, *J* = 7.7/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.64 (dd, 1H, *J* = 8.0/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.69 – 7.83 (m, 2H, ArH), 7.97 – 8.06 (m, 2H, ArH), 12.83 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 117.5, 123.3, 123.8, 129.1 (2C), 129.9 (2C) (CH), 83.7, 116.1, 117.1, 127.6, 129.8, 132.8, 135.1, 145.5 (C); C₁₅H₈Cl₂N₂ (287.14); CHN: ber. C 62.74, H 2.81, N 9.76, gef. C 62.65, H 2.63, N 9.62; MS (EI): *m/z* (%) = 286 [M]⁺• (100), 251 [M⁺•-35] (10); HPLC (isokr.): 99.5 % bei 254 nm und 99.7 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 3.7 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 70:30) (System 1); HPLC (Gradient): 98.2 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 13.7 min, *t*_m = 1.2 min (System 2); λ_{max}: 249 und 306 nm.

2-(4-Chlorphenyl)-7-iod-1*H*-indol-3-carbonitril (19r)

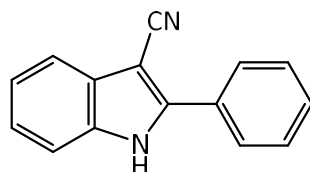
Nach AAV 2 aus 2-(4-Chlorphenyl)-7-iod-1*H*-indol (**29i**, 75 mg, 0.21 mmol), NCTS (**37**, 58 mg, 0.21 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (50 μ L, 0.40 mmol). Es wurde 30 Stunden erhitzt. Während der Reaktion bildete sich ein Feststoff, der vor den Waschschritten abfiltriert wurde. Dieser Feststoff wurde zusammen mit dem nach dem Waschen erhaltenen Rückstand zweimal aus Methanol umkristallisiert. Es wurden 2 mg (2.5 %) eines farblosen, watteartigen Feststoffs erhalten.

Smp.: 261–263 °C; IR (KBr): 3200 cm^{-1} (NH), 2213 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.07 (t, 1H, J = 7.7, H-5), 7.67 (dd, 1H, J = 7.9/0.9 Hz, H-4/H-6), 7.69 – 7.72 (m, 2H, ArH), 7.75 (dd, 1H, J = 7.5/1.0 Hz, H-4/H-6), 7.92 – 8.01 (m, 2H, ArH), 12.37 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 118.4, 123.9, 128.9 (2C), 130.3 (2C), 133.6 (CH), 77.8, 84.1, 116.2, 127.6, 128.4, 135.0, 137.8, 145.4 (C); $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{ClIN}_2$ (378.60); HRMS (EI): m/z [M] $^{+\bullet}$ ber. 377.94152, gef. 377.94223; MS (EI): m/z (%) = 378 [M] $^{+\bullet}$ (100), 216 [$\text{M}^{+\bullet}$ -162] (19); HPLC (isokr.): 98.1 % bei 254 nm und 97.9 % bei 280 nm, t_{ms} = 4.3 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/ H_2O 70:30) (System 1); HPLC (Gradient): 97.3 % bei 254 nm, t_{ms} = 14.2 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 250 und 307 nm.

7-Iod-2-(pyridin-3-yl)-1H-indol-3-carbonitril (**19s**)

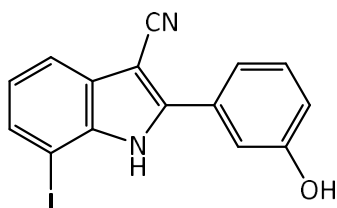
Nach AAV 3 aus 7-Iod-2-(pyridin-3-yl)-1H-indol (**29o**, 103 mg, 0.321 mmol) und Chlorsulfonylisocyanat (**38**, 200 μ L, 2.30 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Ethylacetat-Petrolether-Triethylamin 4:1:1). Es wurden 25 mg (12 %) eines braunen Pulvers erhalten.

Smp.: 157–160 °C; IR (KBr): 3193 cm^{-1} (NH), 2209 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.09 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-5), 7.65 (ddd, 1H, J = 8.0/4.8/1.0 Hz, ArH), 7.70 (dd, 1H, J = 7.9/0.9 Hz, ArH), 7.77 (dd, 1H, J = 7.5/1.0 Hz, ArH), 8.31 (ddd, 1H, J = 8.0/2.3/1.6 Hz, ArH), 8.75 (dd, 1H, J = 4.9/1.6 Hz, ArH), 9.09 (dd, 1H, J = 2.3/0.9 Hz, ArH), 12.52 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 118.5, 123.7, 124.0, 133.6, 136.1, 149.0, 150.7 (CH), 78.0, 84.7, 116.1, 125.2, 128.3, 138.1, 143.9 (C); $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{IN}_3$ (345.14); HRMS (EI): m/z [M] $^{+*}$ ber. 344.97574, gef. 344.97588; MS (EI): m/z = (%) 345 [M] $^{+*}$ (100), 218 [$\text{M}^{+*}-127$] (28); HPLC (isokr.): 99.9 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, t_{ms} = 3.2 min, t_{m} = 1.3 min (ACN/ H_2O 60:40) (System 3); HPLC (Gradient): 98.9 % bei 254 nm, t_{ms} = 11.1 min, t_{m} = 1.2 min (System 3); λ_{max} : 306 nm.

2-Phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (19t)

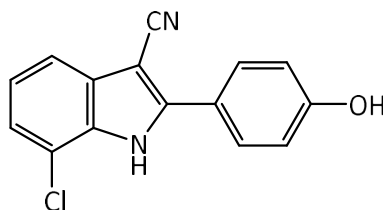
2-Phenylindol (400 mg, 2.07 mmol) wurde in getrocknetem Acetonitril (20 mL) gelöst. Chlorsulfonylisocyanat (**38**, 200 μ L, 2.30 mmol) wurde mit Acetonitril (5 mL) gemischt und unter Eiskühlung und Stickstoffatmosphäre langsam zum Reaktionsansatz getropft. Es wurde 30 min bei Kühlung gerührt. Anschließend wurde DMF (Uvasol, 1 mL) mit Acetonitril (5 mL) gemischt und zur Lösung gegeben. Es wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde Wasser (30 mL) hinzugefügt, der Ansatz in einen Scheidetrichter überführt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert (3x30 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 2:1). Es wurden 242 mg (54 %) gelbe Kristalle erhalten.

Smp.: 238–241 °C; IR (KBr): 3218 cm^{-1} (NH), 2215 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.28 (ddd, 1H, J = 8.1/7.1/1.1 Hz, ArH), 7.33 (ddd, 1H, J = 8.1/7.1/1.3 Hz, ArH), 7.50 – 7.73 (m, 5H, ArH), 7.95 – 8.04 (m, 2H, ArH), 12.62 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 112.7, 118.4, 122.0, 123.9, 127.0 (2C), 129.32 (2C), 130.0 (CH), 81.4, 117.0, 128.3, 129.34, , 135.5, 144.7 (C); $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_2$ (218.26): ber. C 82.55, H 4.62, N 12.84, gef. C 82.67, H 4.37, N 12.73; MS (APCI): m/z (%) = 219 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 100.0 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, t_{ms} = 3.1 min, t_{m} = 1.6 min (ACN/ H_2O 60:40) (System 3); HPLC (Gradient): 99.2 % bei 254 nm, t_{ms} = 11.8 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 240 und 307 nm.

2-(3-Hydroxyphenyl)-7-iod-1*H*-indol-3-carbonitril (**19u**)

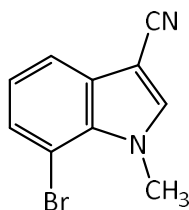
Unter Eiskühlung und Stickstoffatmosphäre wurde 7-Iod-2-(3-methoxyphenyl)-1*H*-indol-3-carbonitril (**19h**, 78 mg, 0.21 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (10 mL) gelöst. Bortri-bromid (1 M in Dichlormethan, 1.0 mL, 1.0 mmol) wurde langsam hinzuge tropft. Anschließend wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde Wasser (10 mL) hinzugefügt, der Ansatz in einen Scheidetrichter überführt und die wässrige Phase mit Ethyl-acetat extrahiert (3x10 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natri-umchloridlösung (20 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 2:1). Es wurden 36 mg (47 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

Smp.: 252–255 °C; IR (KBr): 3212 cm^{-1} (NH/OH), 2218 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 6.97 (ddd, 1H, J = 8.1/2.4/1.0 Hz, ArH), 7.06 (t, 1H, J = 7.8 Hz, ArH), 7.31 – 7.33 (m, 1H, ArH), 7.35 (ddd, 1H, J = 7.7/1.7/1.1 Hz, ArH), 7.40 (t, 1H, J = 7.9 Hz, ArH), 7.65 (dt, 1H, J = 7.9/0.7 Hz), 7.73 (dd, 1H, J = 7.5/0.9 Hz), 9.88 (s, 1H, OH), 12.25 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.7 MHz): δ (ppm) = 115.1, 117.1, 118.2, 119.1, 123.7, 129.9, 133.3 (CH), 77.6, 83.5, 116.3, 128.4, 129.8, 137.6, 146.9, 157.5 (C); $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{IN}_2\text{O}$ (360.15); HRMS (EI): m/z [M] $^{+*}$ ber. 359.97541, gef. 359.97562; MS (APCI): m/z (%) = 361 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (100); HPLC (isokr.): 99.8 % bei 254 nm und 99.9 % bei 280 nm, t_{ms} = 5.8 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/ H_2O 50:50) (System 3); HPLC (Gradient): 97.0 % bei 254 nm, t_{ms} = 11.7 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 220 und 306 nm.

7-Chlor-2-(4-hydroxyphenyl)-1H-indol-3-carbonitril (**19v**)

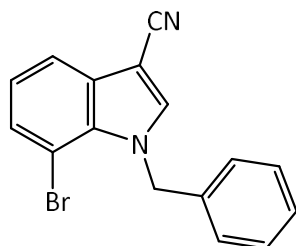
7-Chlor-2-(4-hydroxyphenyl)-1H-indol (**29p**, 60 mg, 0.25 mmol) und NCTS (**37**, 67 mg, 0.25 mmol) wurden in einem zuvor mit Argon gespülten Mikrowellenreaktionsgefäß in getrocknetem Toluol (2.0 mL) gelöst. Nach der Zugabe von Bortrifluoriddiethyletherat (500 µL, 3.95 mmol) wurde der Ansatz für 2 h auf 130 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung mit Toluol (10 mL) verdünnt und mit Wasser (3 mL) gewaschen. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurde der Rückstand aus Toluol-Ethylacetat (10:32) umkristallisiert. Um eine ausreichende Reinheit für die biologische Testung zu erreichen wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Fließmittel: Acetonitril-Wasser 50:50). Es wurden 2 mg (3 %) eines weißen Pulvers erhalten.

Schmp.: 299–302 °C; $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 6.94 – 7.01 (m, 2H, ArH), 7.23 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-5), 7.35 (d, 1H, J = 7.7 Hz, ArH), 7.57 (dd, 1H, J = 7.9/1.0 Hz, ArH), 7.80 – 7.90 (m, 2H, ArH), 10.13 (s, 1H, OH), 12.51 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 115.8, 117.0, 129.7 (CH) Aufgrund der geringen Substanzmenge sind weitere C nicht detektierbar; $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}$ (268.70); HRMS (EI): m/z [$\text{M}]^{+*}$ ber. 268.03979, gef. 268.03952; MS (EI): m/z (%) = 268 [$\text{M}]^{+*}$ (100); HPLC (isokr.): 99.9 % bei 254 nm und 99.9 % bei 280 nm, t_{ms} = 4.4 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/ H_2O 50:50) (System 3); HPLC (Gradient): 98.1 % bei 254 nm, t_{ms} = 10.8 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 256 und 311 nm.

7-Brom-1-methyl-1*H*-indol-3-carbonitril (20a)

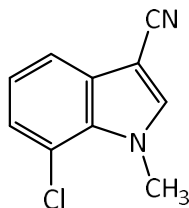
Nach AAV 2 aus 7-Brom-1-methyl-1*H*-indol (**35a**, 120 mg, 0.571 mmol), NCTS (**37**, 164 mg, 0.599 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (0.10 mL, 0.789 mmol). Es wurde 22 Stunden erhitzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Dichlormethan 1:1.5) aufgereinigt. Nach anschließender Umkristallisation aus Ethylacetat-*n*-Hexan 1:10 wurden 30 mg (22 %) eines schwach bräunlichen Pulvers erhalten.

Smp.: 158–159 °C; IR (KBr): 2212 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 4.17 (s, 3H, CH₃), 7.17 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.54 (dd, 1H, *J* = 7.7/1.0 Hz, H-4/H-6), 7.65 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H-4/H-6), 8.32 (s, 1H, H-2); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 37.5 (CH₃), 118.6, 123.4, 128.4, 140.5 (CH), 83.7, 104.5, 115.1, 130.1, 132.0 (C); C₁₀H₇BrN₂ (235.08); CHN: ber. C 51.09, H 3.00, N 11.92, gef. C 51.15, H 3.01, N 11.59; MS (EI): *m/z* (%) = 234 [M]⁺• (98), 219 [M⁺•-15] (2), 155 [M⁺•-79] (11); HPLC (isokr.): 99.2 % bei 254 nm und 99.8 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 6.3 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 50:50) (System 1); HPLC (Gradient): 99.7 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 12.1 min, *t*_m = 1.2 min (System 2); λ_{max}: 287 nm.

1-Benzyl-7-brom-1*H*-indol-3-carbonitril (20b)

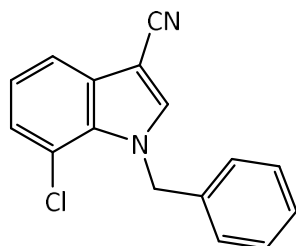
Nach AAV 2 aus 1-Benzyl-7-brom-1*H*-indol (**35b**, 300 mg, 1.05 mmol), NCTS (**37**, 285 mg, 1.05 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (0.15 mL, 1.18 mmol). Es wurde 46 Stunden erhitzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat-Triethylamin 5:1:1) aufgereinigt. Nach anschließender Umkristallisation aus Methanol wurden 64 mg (20 %) eines braunen Feststoffs erhalten.

Smp.: 126–128 °C; IR (KBr): 2219 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 5.89 (s, 2H, CH_2), 6.93 – 7.07 (m, 2H, ArH), 7.21 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.24 – 7.35 (m, 3H, ArH), 7.53 (dd, 1H, $J = 7.7/1.0$ Hz, H-4/H-6), 7.72 (dd, 1H, $J = 8.0/1.0$ Hz, H-4/H-6), 8.55 (s, 1H, H-2); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 51.4 (CH_2), 118.8, 123.7, 125.8 (2C), 127.4, 128.7 (2C), 129.0, 140.5 (CH), 85.1, 104.3, 114.9, 130.3, 131.5, 138.0 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrN}_2$ (311.18); CHN: ber. C 61.76, H 3.56, N 9.00, gef. C 62.11, H 3.45, N 8.86; MS (EI): m/z (%) = 310 $[\text{M}]^{+\bullet}$ (19), 91 $[\text{M}^{+\bullet}-219]$ (100); HPLC (isokr.): 97.2 % bei 254 nm und 97.9 % bei 280 nm, $t_{\text{ms}} = 3.8$ min, $t_{\text{m}} = 1.1$ min (ACN/ H_2O 70:30) (System 1); HPLC (Gradient): 95.0 % bei 254 nm, $t_{\text{ms}} = 13.5$ min, $t_{\text{m}} = 1.2$ min (System 2); λ_{max} : 279 nm.

7-Chlor-1-methyl-1*H*-indol-3-carbonitril (20c)

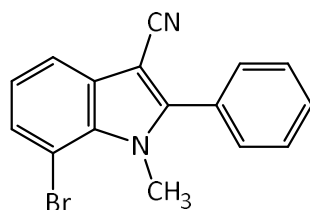
Nach AAV 2 aus 7-Chlor-1-methyl-1*H*-indol (**35c**, 190 mg, 1.15 mmol), NCTS (**37**, 313 mg, 1.15 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (0.20 mL, 1.58 mmol). Es wurde 22 Stunden erhitzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 5:1) aufgereinigt. Anschließend wurde zweimal aus Methanol umkristallisiert. Es wurden 25 mg (11 %) eines gelb-rötlichen Pulvers erhalten.

Smp.: 146–147 °C; IR (KBr): 2220 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 4.16 (s, 3H, CH₃), 7.24 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.37 (dd, 1H, *J* = 7.7/1.0 Hz, H-4/H-6), 7.61 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.0 Hz, H-4/H-6), 8.31 (s, 1H, H-2); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 37.4 (CH₃), 118.1, 123.1, 124.9, 140.3 (CH), 83.8, 115.2, 117.4, 130.2, 130.9 (C); C₁₀H₇ClN₂ (190.03); CHN: ber. C 63.01, H 3.70, N 14.70, gef. C 62.89, H 3.59, N 14.48; MS (EI): *m/z* (%) = 190 [M]⁺• (100); HPLC (isokr.): 99.4 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 5.5 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 50:50) (System 1); HPLC (Gradient): 96.9 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 11.3 min, *t*_m = 1.2 min (System 2); λ_{max}: 287 nm.

1-Benzyl-7-chlor-1*H*-indol-3-carbonitril (20d)

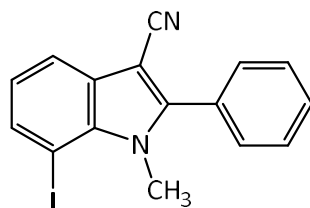
Nach AAV 2 aus 1-Benzyl-7-chlor-1*H*-indol (**35d**, 257 mg, 1.06 mmol), NCTS (**37**, 291 mg, 1.07 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (0.15 mL, 1.18 mmol). Es wurde 27 Stunden erhitzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat-Triethylamin 5:1:1) aufgereinigt. Anschließend wurden 122 mg (43 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

Smp.: 117–119 °C; IR (KBr): 2218 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 5.84 (s, 2H, CH_2), 6.98 – 7.09 (m, 2H, ArH), 7.20 – 7.40 (m, 5H, ArH), 7.67 (dd, 1H, $J = 7.9/1.1$ Hz, H-4/H-6), 8.56 (s, 1H, H-2); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 51.9 (CH_2), 118.3, 123.4, 125.4, 125.8 (2C), 127.5 (2C), 128.7, 140.3 (CH), 85.2, 115.0, 117.1, 130.3, 130.4, 128.0 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2$ (266.73); CHN: ber. C 72.05, H 4.16, N 10.50, gef. C 72.21, H 4.22, N 10.10; MS (EI): m/z (%) = 266 [$\text{M}]^{+*}$ (28), 91 [$\text{M}^{+*}-175$] (100); HPLC (isokr.): 99.2 % bei 254 nm und 99.7 % bei 280 nm, $t_{\text{ms}} = 3.6$ min, $t_{\text{m}} = 1.1$ min (ACN/ H_2O 70:30) (System 1); HPLC (Gradient): 95.8 % bei 254 nm, $t_{\text{ms}} = 13.5$ min, $t_{\text{m}} = 1.2$ min (System 2); λ_{max} : 221 und 277 nm.

7-Brom-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (20e)

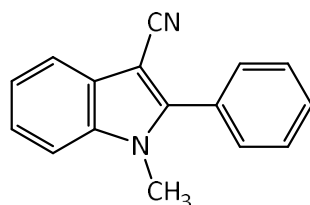
Nach AAV 2 aus 7-Brom-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol (**35e**, 121 mg, 0.423 mmol) und NCTS (**37**, 115 mg, 0.423 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (200 μ l, 1.58 mmol). Es wurde für 24 Stunden erhitzt. Der Rückstand wurde aus Methanol (12 mL) umkristallisiert. Es wurden 54 mg (41 %) grünliche Kristalle erhalten.

Smp.: 176-178 °C; IR (KBr): 2212 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.02 (s, 3H, CH_3), 7.23 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, H-5), 7.61 (dd, 1H, $J = 7.7/1.0$ Hz, ArH), 7.62-7.70 (m, 6H, ArH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 35.3 (CH_3), 118.4, 123.8, 129.0 (2C), 129.1, 130.1 (2C), 130.4 (CH), 85.0, 104.6, 115.5, 128.0, 129.7, 132.9, 150.2 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrN}_2$ (311.18); CHN: ber. C 61.76, H 3.56, N 9.00, gef. C 61.79, H 3.47, N 8.87; MS (APCI): m/z (%) = 311 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 99.3 % bei 254 nm und 99.7 % bei 280 nm, $t_{\text{ms}} = 4.7$ min, $t_{\text{m}} = 1.3$ min (ACN/ H_2O 70:30) (System 3); HPLC (Gradient): 98.7 % at 254 nm, $t_{\text{ms}} = 13.3$ min, $t_{\text{m}} = 1.2$ min (System 3); λ_{max} 239, 297 nm.

7-Iod-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (20f)

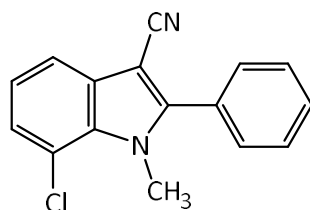
Nach AAV 2 aus 7-Iod-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol (**35f**, 202 mg, 0.605 mmol), NCTS (**37**, 165 mg, 0.606 mmol) und Bortrifluoriddiethyletherat (250 μ L, 1.97 mmol). Es wurde 24 Stunden erhitzt. Der Rückstand wurde aus Methanol umkristallisiert. Es wurden 79 mg (36 %) eines beigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 154 – 157 °C; IR (KBr): 2212 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.03 (s, 3H, CH_3), 7.06 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.60 – 7.73 (m, 6H, ArH), 7.89 (dd, 1H, $J = 7.5/1.1$ Hz, H-4/H-6); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 35.6 (CH_3), 118.8, 124.2, 129.0 (2C), 130.1 (2C), 130.3, 136.4 (CH), 75.8, 84.7, 115.4, 128.2, 129.1, 135.6, 150.2 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{IN}_2$ (358.18); CHN: ber. C 53.65, H 3.10, N 7.82, gef. C 53.69, H 3.05, N 7.63 (Einfachbestimmung); MS (EI): m/z (%) = 358 [$\text{M}^{+\bullet}$] (100), 229 [$\text{M}^{+\bullet}-129$] (21), 204 [$\text{M}^{+\bullet}-154$] (13), 102 [$\text{M}^{+\bullet}-256$] (11); HPLC (isokr.): 96.4 % bei 254 nm und 97.24 % bei 280 nm, $t_{\text{ms}} = 4.8$ min, $t_{\text{m}} = 1.1$ min (ACN/ H_2O 70:30) (System 1); HPLC (Gradient): 98.9 % bei 254 nm, $t_{\text{ms}} = 14.5$ min, $t_{\text{m}} = 1.2$ min (System 2); λ_{max} : 300 nm.

1-Methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (20g)

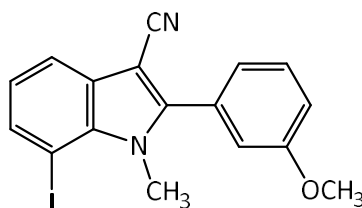
Nach AAV 4 aus 2-Phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (**19t**, 150 mg, 0.687 mmol), Natriumhydrid (90 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 1.4 mmol NaH) und Iodmethan (50 μ L, 0.800 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: *n*-Hexan-Ethylacetat 2:1). Es wurden 84 mg (53 %) eines weißen Pulvers erhalten.

Smp: 117–118 °C; IR (KBr): 2213 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 400.4MHz): δ (ppm) = 3.78 (s, 3H, CH_3), 7.30 – 7.36 (m, 1H, ArH), 7.41 (ddd, 1H, $J = 8.3/7.1/1.3$ Hz, ArH), 7.57 – 7.80 (m, 7H, ArH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 31.7 (CH_3), 111.8, 118.4, 122.4, 123.8, 129.0 (2C), 129.8 (2C), 130.0 (CH), 83.7, 116.4, 126.7, 128.4, 136.6, 147.8 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2$ (232.29); CHN: ber. C 82.73, H 5.21, N 12.06, gef. C 82.33, H 5.44, N 11.83; MS (APCI): m/z (%) = 233 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 97.3 % bei 254 nm und 97.7 % bei 280 nm, $t_{\text{ms}} = 4.2$ min, $t_{\text{m}} = 1.1$ min (ACN/ H_2O 60:40) (System 3); HPLC (Gradient): 99.2 % bei 254 nm, $t_{\text{ms}} = 11.8$ min, $t_{\text{m}} = 1.2$ min (System 3); λ_{max} : 240 und 297 nm.

7-Chlor-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (20h)

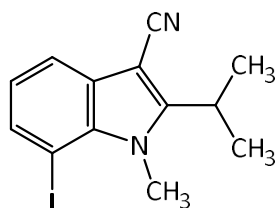
Nach AAV 4 aus 7-Chlor-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonitril (**19d**, 66 mg, 0.261 mmol), Natriumhydrid (45 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 0.7 mmol NaH) und Iodmethan (20 μ L, 0.32 mmol). Der Rückstand wurde mit *n*-Hexan gewaschen. Es wurden 30 mg (43 %) eines gelben, kristallinen Pulvers erhalten.

Smp.: 169–170 °C; IR (KBr): 2213 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 4.01 (s, 3H, CH₃), 7.30 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-5), 7.43 (dd, 1H, J = 7.7/1.1 Hz, ArH), 7.59 – 7.73 (m, 6H, ArH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 35.2 (CH₃), 117.9, 123.3, 125.5, 129.0 (2C), 130.1 (2C), 130.4 (CH), 85.1, 155.5, 117.4, 127.9, 129.7, 131.7, 150.0 (C); C₁₆H₁₁ClN₂ (266.73); CHN: ber. C 72.05, H 4.16, N 10.50, gef. C 72.06, H 4.17, N 10.26; MS (APCI): m/z (%) = 267 [M+H]⁺ (100); HPLC (isokr.): 99.4 % bei 254 nm und 98.9 % bei 280 nm, t_{ms} = 4.2 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/H₂O 70:30) (System 3); HPLC (Gradient): 96.9 % bei 254 nm, t_{ms} = 12.6 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 239 und 297 nm.

7-Iod-2-(3-methoxyphenyl)-1-methyl-1*H*-indol-3-carbonitril (20i)

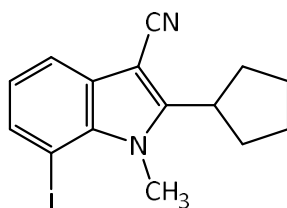
Nach AAV 4 aus 7-Iod-2-(3-methoxyphenyl)-1*H*-indol-3-carbonitril (**19h**, 130 mg, 0.347 mmol), Natriumhydrid (109 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 2.73 mmol NaH) und Iodmethan (50 μ L, 0.80 mmol). Der Rückstand wurde in Acetonitril-DMSO (7:1) unter Erwärmen gelöst und durch die Zugabe von Wasser (10 mL) ausgefällt und abgesaugt. Der erhaltene Niederschlag (22 mg) wurde anschließend aus Toluol umkristallisiert. Es wurden 16 mg (12 %) eines weiß-gelben kristallinen Pulvers erhalten.

Smp.: 198–200 °C; IR (KBr): 2213 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 500.3 MHz): δ (ppm) = 3.85 (s, 3H, CH₃), 4.04 (s, 3H, CH₃), 7.06 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-5), 7.14 – 7.26 (m, 3H, ArH), 7.53 – 7.59 (m, 1H, ArH), 7.68 (dd, 1H, J = 7.8/1.1 Hz, ArH), 7.89 (dd, 1H, J = 7.5/1.1 Hz, ArH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 125.8 MHz): δ (ppm) = 35.6, 55.4 (CH₃), 115.6, 116.0, 118.9, 122.3, 124.2, 130.3, 136.4 (CH), 75.8, 84.7, 115.4, 129.0, 129.4, 135.5, 150.0, 159.4 (C); C₁₇H₁₃IN₂O (388.21); CHN: ber. C 52.60, H 3.38, N 7.22, gef. C 52.80, H 3.23, N 6.88; MS (APCI): m/z (%) = 389 [M+H]⁺ (100); HPLC (isokr.): 99.9 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, t_{ms} = 5.1 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/H₂O 70:30) (System 3); HPLC (Gradient): 98.6 % bei 254 nm, t_{ms} = 13.5 min, t_{m} = 1.2 min (System 3); λ_{max} : 255 und 300 nm.

7-Iod-2-isopropyl-1-methyl-1H-indol-3-carbonitril (20j)

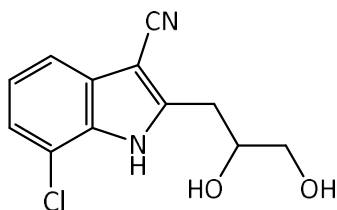
Nach AAV 4 aus 7-Iod-2-isopropyl-1H-indol-3-carbonitril (**19j**, 36 mg, 0.116 mmol), Natriumhydrid (107 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 2.68 mmol NaH) und Iodmethan (50 μ L, 0.80 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 5:1). Es wurden 26 mg (68 %) eines beigen kristallinen Feststoffs erhalten.

Smp.: 117–119 °C; IR (KBr): 2967, 2927 cm^{-1} (aliph. C-H), 2204 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 500.3 MHz): δ (ppm) = 1.44 (d, 6H, J = 7.0 Hz, 2xCH $_3$), 3.45 (hept, 1H, J = 7.0 Hz, CH), 4.12 (s, 3H, NCH $_3$), 6.97 (t, 1H, J = 7.6 Hz, H-5), 7.55 (dd, 1H, J = 7.8/1.1 Hz, ArH), 7.79 (dd, 1H, J = 7.6/1.0 Hz, ArH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 125.8 MHz): δ (ppm) = 21.3 (2C), 33.2 (CH $_3$), 26.2, 118.1, 123.6, 135.9 (CH), 75.0, 80.9, 115.7, 129.8, 134.4, 156.5 (C); C $_{13}$ H $_{13}$ IN $_2$ (324.17); HRMS (EI): m/z [M] $^{+\bullet}$ ber. 324.01179, gef. 324.01143; MS (APCI): m/z (%) = 325 [M+H] $^+$ (100), 309 [M-15] $^+$ (12); HPLC (isokr.): 99.9 % bei 254 nm und 100.0 % bei 280 nm, t_{ms} = 4.4 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/H $_2$ O 70:30) (System 3); HPLC (Gradient): 99.5 % bei 254 nm, t_{ms} = 13.1 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 224 und 289 nm.

2-Cyclopentyl-7-iod-1-methyl-1*H*-indol-3-carbonitril (20k)

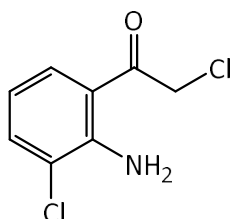
Nach AAV 4 aus 2-Cyclopentyl-7-iod -1*H*-indol-3-carbonitril (**19i**, 56 mg, 0.167 mmol), Natriumhydrid (80 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 2.1 mmol NaH) und Iodmethan (50 μ L, 0.80 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 5:1). Es wurden 44 mg (76 %) eines weißen kristallinen Feststoffs erhalten.

Smp.: 140–142 °C; IR (KBr): 2932, 2862 cm^{-1} (aliph. C-H), 2209 cm^{-1} (C \equiv N); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 500.3 MHz): δ (ppm) = 1.65 – 1.80 (m, 2H, CH₂), 1.80 – 1.99 (m, 4H, 2xCH₂), 2.11 – 2.23 (m, 2H, CH₂), 3.48 (quint, 1H, J = 8.6 Hz, CH), 4.12 (s, 3H, CH₃), 6.96 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-5), 7.54 (dd, 1H, J = 7.8 Hz/1.2 Hz, H-4/H-6), 7.78 (dd, 1H, J = 7.5/1.1 Hz, H-4/H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 125.8 MHz): δ (ppm) = 33.5 (CH₃), 25.5 (2C), 32.1 (2C) (CH₂), 37.0, 118.1, 123.6, 135.9 (CH), 74.9, 81.1, 115.6, 129.8, 134.6, 155.1 (C); C₁₅H₁₅IN₂ (350.20); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 350.02744, gef. 350.02717; MS (APCI): m/z (%) = 351 [M+H]⁺ (100), 283 [M-67]⁺ (12); HPLC (isokr.): 98.8 % bei 254 nm und 99.6 % bei 280 nm, t_{ms} = 6.3 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/H₂O 70:30) (System 3); HPLC (Gradient): 96.7 % bei 254 nm, t_{ms} = 14.0 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 236 und 289 nm.

7-Chlor-2-(2,3-dihydroxypropyl)-1H-indol-3-carbonitril (21)

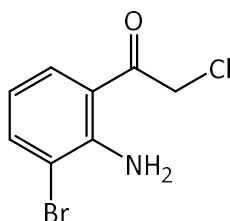
2-Allyl-7-chlor-1H-indol-3-carbonitril (**19I**, 55 mg, 0.254 mmol) wurde in einem Aceton-Wasser-Gemisch (4:1, 10 mL) gelöst. Bei Raumtemperatur wurde zunächst schrittweise *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (107 mg, 0.783 mmol) hinzugefügt und anschließend wurde Osmiumtetroxid (2.5 %ige Lösung in *tert*-Butanol, 250 μ L, 0.0199 mmol) hinzugegeben. Es wurde 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde gesättigte Natriumthiosulfat-Lösung (20 mL) hinzugegeben und für 2 h gerührt. Der Ansatz wurde in einen Scheidetrichter überführt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurden 56 mg (88 %) eines beigen Feststoffs erhalten.

Schmp.: 130–132 °C; IR (KBr): 3374/3254 cm^{-1} (NH/OH), 2221 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.87 (dd, 1H, $J = 14.1/9.0$ Hz, C(1')H), 3.10 (dd, 1H, $J = 14.1/4.2$ Hz, C(1')H), 3.36 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, C(3')H), 3.41 (dt, 1H, $J = 11.0/5.6$ Hz, C(3')H), 3.91 – 4.02 (m, 1H, C(2')H), 4.79 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, OH), 4.93 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, OH), 7.19 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.30 (dd, 1H, $J = 7.7/0.9$ Hz, H-6), 7.51 (dd, 1H, $J = 8.0/0.9$ Hz, H-4), 12.34 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.1 (CH_2), 65.7, 70.7, 116.8, 122.2, 122.4 (CH), 84.8, 115.9, 116.4, 129.1, 131.8, 149.5 (C); $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (250.68); HRMS (EI): m/z [M] $^{+\bullet}$ ber. 250.05036, gef. 250.05021; MS (APCI): m/z (%) = 251 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (34), 233 [$\text{M}-17$] $^+$ (39), 203 [$\text{M}-48$] $^+$ (16), 189 [$\text{M}-62$] $^+$ (100); HPLC (isokr.): 99.5 % bei 254 nm und 99.3 % bei 280 nm, $t_{\text{ms}} = 4.7$ min, $t_{\text{m}} = 1.1$ min (ACN/ H_2O 30:70) (System 3); HPLC (Gradient): 99.7 % bei 254 nm, $t_{\text{ms}} = 8.4$ min, $t_{\text{m}} = 1.2$ min (System 3); λ_{max} : 278 nm.

1-(2-Amino-3-chlorphenyl)-2-chlorethanon (**24a**)¹¹²

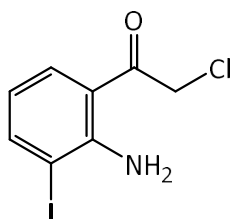
Zunächst wurde unter Stickstoffatmosphäre eine eisgekühlte Suspension aus Aluminiumchlorid (2.803 g, 21.02 mmol) und Bortrichlorid (1M Lösung in Dichlormethan, 20.0 mL, 20.0 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (30 mL) hergestellt. Zu dieser Suspension wurden schrittweise 2-Chloranilin (**22a**, 2.0 mL, 19 mmol) und Chloracetonitril (**23**, 3.0 mL, 47 mmol) unter Rühren hinzugefügt. Es wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 11 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Währenddessen wurde verlorenes Lösemittel ersetzt. Anschließend wurde auf 0 °C gekühlt, Salzsäure (2 mol/L, 30 mL) zugesetzt und für 20 min zum Rückfluss erhitzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3x30 mL) extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurde Natriumchlorid (1 g) zugesetzt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Ethylacetat-*n*-Hexan 1:5) aufgereinigt. Es wurden 2.00 g (52 %) gelbe Kristalle erhalten.

Smp.: 59-60 °C (Lit.¹¹²: 104-106 °C) Für die starke Abweichung des gemessenen Schmelzpunkts von dem Literaturwert konnte keine Erklärung gefunden werden; IR (KBr): 3482 cm⁻¹, 3356 cm⁻¹ (NH₂), 1665 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 5.10 (s, 2H, CH₂), 6.64 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz, H-5), 7.29 (s, 2H, NH₂), 7.56 (dd, 1H, *J* = 1.4/7.7 Hz, H-4/H-6), 7.79 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.4 Hz, H-4/H-6); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 47.8 (CH₂), 115.0, 130.6, 134.6 (CH), 115.8, 119.4, 146.7 (C), 192.8 (C=O); C₈H₇Cl₂NO (204.05).

1-(2-Amino-3-bromphenyl)-2-chlorethanon (**24b**)

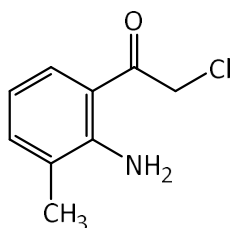
Unter Stickstoffatmosphäre wurde eine eisgekühlte Suspension aus Aluminiumchlorid (2.80 g, 21.0 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (30 mL) hergestellt und Bortrichlorid (1 M Lösung in Dichlormethan, 20.0 mL, 20.0 mmol) unter Rühren langsam hinzugegot. Anschließend wurden Chloracetonitril (**23**, 3.0 mL, 47 mmol) und 2-Bromanilin (**22b**, 2.0 mL, 18 mmol) nacheinander schrittweise hinzugefügt. Anschließend wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und für 7 h zum Rückfluss erhitzt, wobei verlorenes Lösemittel ersetzt wurde. Danach wurde der Ansatz abkühlen gelassen, unter Kühlung im Eisbad Salzsäure (2 mol/L, 20 mL) hinzugefügt und erneut für 30 Minuten zum Rückfluss erhitzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (5x30 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit viel Petrolether gewaschen. Es wurden 2.297 g (51 %) gelb-braune Kristalle erhalten.

Smp.: 77–80 °C (Lit. ¹³⁷: 75–76 °C); IR (KBr): 3468, 3345 cm⁻¹ (NH₂), 1667 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 5.11 (s, 2H, CH₂), 6.59 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-5), 7.25 (s, 2H, NH₂), 7.72 (dd, 1H, *J* = 7.7/1.4 Hz, H-4/H-6), 7.84 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.4 Hz, H-4/H-6); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 47.8 (CH₂), 115.8, 131.3, 138.1 (CH), 110.0, 115.8, 147.5 (C), 192.7 (C=O); C₈H₇BrClNO (248.50); CHN: ber. C 38.67, H 2.84, N 5.64, gef. C 38.95, H 2.66, N 5.48; MS (APCI): *m/z* (%) = 248 [M+H]⁺ (95), 230 [M-17]⁺ (35), 198 [M-49]⁺ (31), 151 [M-96]⁺ (33).

1-(2-Amino-3-iodphenyl)-2-chlorethanon (**24c**)

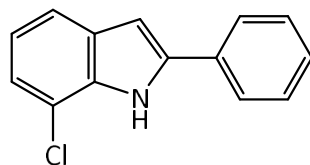
Unter Stickstoffatmosphäre wurde eine eisgekühlte Suspension aus Aluminiumchlorid (2.857 g, 21.43 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (50 mL) hergestellt und Bortrichlorid (1 M Lösung in Dichlormethan, 20.0 mL, 20.0 mmol) unter Rühren langsam hinzuge tropft. Chloracetonitril (**23**, 5.0 mL, 79 mmol) und eine Lösung von 2-Iodanilin (**22c**, 2.509 g, 11.46 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (10 mL) wurden schrittweise zu der Suspension hinzugefügt. Anschließend wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und für 23 Stunden zum Rückfluss erhitzt, wobei verlorenes Lösemittel ersetzt wurde. Danach wurde der Ansatz abkühlen gelassen, unter Kühlung im Eisbad Salzsäure (2 mol/L, 50 mL) hinzugefügt und erneut für 20 Minuten zum Rückfluss erhitzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (2x30 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 5:1) aufgereinigt. Das gewonnene Produkt wurde mit Petrolether gewaschen. Es wurden 587 mg (17 %) hellgelbe Kristalle erhalten.

Smp.: 94–95 °C; IR (KBr): 3449, 3327 cm^{-1} (NH_2), 1666 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 5.11 (s, 2H, CH_2), 6.43 – 6.48 (m, 1H, H-5), 7.17 (s, 2H, NH_2), 7.84 (dd, 1H, J = 8.1/1.4 Hz, ArH), 7.92 (dd, 1H, J = 7.5/1.5 Hz, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 47.5 (CH_2), 116.9, 132.0, 144.9 (CH), 86.8, 115.0, 149.8 (C), 192.6 (C=O); $\text{C}_8\text{H}_7\text{ClINO}$ (295.50); CHN: ber. C 32.52, H 2.39, N 4.74, gef. C 32.62, H 2.19, N 4.48; MS (EI): m/z (%) = 295 [$\text{M}]^{+}$ (40), 246 [$\text{M}^{+}-49$] (100); HPLC (Gradient): 99.6 % bei 254 nm, t_{ms} = 11.9 min, t_{m} = 1.2 min (System 2).

1-(2-Amino-3-methylphenyl)-2-chlorethanon (**24d**)

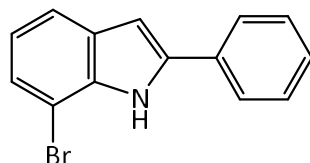
Unter Stickstoffatmosphäre wurde eine eisgekühlte Suspension aus Aluminiumchlorid (1.70 g, 12.7 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (30 mL) hergestellt und Bortrichlorid (1.0 M Lösung in Dichlormethan, 17.0 mL, 17.0 mmol) unter Rühren langsam hinzugetropft. Anschließend wurden *o*-Toluidin (**22d**, 1.5 mL, 14 mmol) und Chloracetonitril (**23**, 2.6 mL, 41 mmol) schrittweise zu der Suspension hinzugefügt. Anschließend wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und für 7 Stunden zum Rückfluss erhitzt, wobei verlorenes Lösemittel ersetzt wurde. Nachdem sich der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt hatte, wurde unter Kühlung im Eisbad Salzsäure (2 mol/L, 20 mL) hinzugefügt und anschließend erneut für 30 Minuten zum Rückfluss erhitzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (6 x 30 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Es wurden 1579 mg (61 %) einer schwarzen, harzigen Substanz erhalten.

IR (NaCl): 3467, 3350 cm^{-1} (NH_2), 1657 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 2.12 (s, 3H, CH_3), 4.75 (s, 2H), 5.03 (s, 2H), 6.52 (dd, 1H, $J = 8.2/7.1$ Hz, ArH), 7.23 (ddt, 1H, $J = 7.1/1.5/0.9$ Hz, ArH), 7.63 (dd, 1H, $J = 8.2/1.2$ Hz, ArH) Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein¹³⁸; $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 17.4 (CH_3), 47.7 (CH_2), 114.3, 129.2, 135.4 (CH), 113.8, 123.7, 149.9 (C), 192.9 (C=O); $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClNO}$ (183.64); MS (APCI): m/z (%) = 184 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (89), 166 $[\text{M}-17]^+$ (100), 148 (73), 131 (78), 120 (20).

7-Chlor-2-phenyl-1*H*-indol (**29a**)

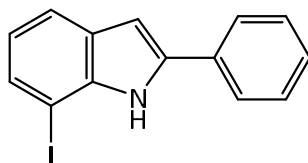
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-chlorphenyl)-2-chlorethanon (**24a**, 206 mg, 1.01 mmol) und Phenylmagnesiumchlorid (1.0 M in 2-Methyltetrahydrofuran, 2.5 mL, 2.5 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (2 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 15 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3x5 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (3x5 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösemittels im Vakuum wurden 211 mg (92 %) eines braunen Pulvers erhalten.

Smp.: 103–109 °C (Lit. ¹³⁹: 100 °C); IR (KBr): 3437 cm⁻¹ (NH); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 6.92 – 7.10 (m, 2H, ArH), 7.17 (dd, 1H, *J* = 7.5/1.0 Hz, ArH), 7.22 – 7.40 (m, 1H, ArH), 7.40 – 7.95 (m, 3H, ArH), 7.95–8.04 (m, 2H, ArH), 11.54 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 100.3, 118.9, 120.4, 121.2, 125.9 (2C), 127.8, 128.7 (2C) (CH), 115.7, 130.5, 131.6, 134.0, 139.5 (C); C₁₄H₁₀ClN (227.69).

7-Brom-2-phenyl-1*H*-indol (29b)

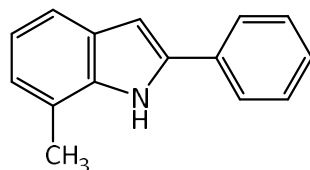
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-bromphenyl)-2-chlorethanon (**24b**, 601 mg, 2.42 mmol) und Phenylmagnesiumchlorid (1.0 M in 2-Methyltetrahydrofuran, 6.0 mL, 6.0 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 20 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3x20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (25 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurden 556 mg (84 %) eines orangen, kristallinen Pulvers erhalten.

Smp.: 114–117 °C (Lit. ¹⁴⁰: 115–117 °C); IR (KBr): 3436 cm⁻¹ (NH); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 6.96 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-5), 7.02 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H-3), 7.32 (dd, 1H, *J* = 7.6/1.0 Hz, H-4/H-6), 7.33 – 7.39 (m, 1H, ArH), 7.41 – 7.52 (m, 2H, ArH), 7.54 – 7.58 (m, 1H, ArH), 7.93 – 8.04 (m, 2H, ArH), 11.33 – 11.38 (m, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 100.5, 119.4, 120.9, 124.4, 126.0 (2C), 127.8, 128.6 (2C) (CH), 103.9, 130.3, 131.5, 135.6, 139.5 (C); CHN: ber. C 61.79, H 3.70, N 5.15, gef. C 61.64, H 3.65, N 5.03; C₁₄H₁₀BrN (272.15); MS (APCI): *m/z* (%) = 272 [M+H]⁺ (94), 193 [M-78]⁺ (100); HPLC (Gradient): 98.4 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 14.1 min, *t*_m = 1.2 min (System 2).

7-Iod-2-phenyl-1H-indol (29c)

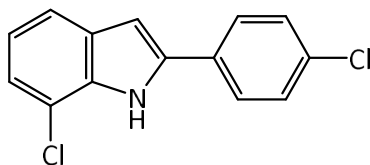
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-iodphenyl)-2-chlorethanon (**24c**, 301 mg, 1.02 mmol) und Phenylmagnesiumchlorid (1.0 M in 2-Methyltetrahydrofuran, 2.6 mL, 2.6 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 15 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3x10 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit gesättigter Natriumchloridlösung (3x25 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 10:1) aufgereinigt. Es wurden 186 mg (57 %) eines gelblichen Pulvers erhalten.

Smp.: 128–130 °C; IR (KBr): 3434 cm^{-1} (NH); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 6.82 (t, 1H, J = 7.6 Hz, H-5), 7.03 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H-3), 7.31 – 7.40 (m, 1H, ArH), 7.40 – 7.68 (m, 4H, ArH), 7.92 – 8.02 (m, 2H, ArH), 11.02 (d, 1H, J = 2.0 Hz, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 100.8, 120.0, 121.4, 126.2 (2C), 127.8, 128.6 (2C), 131.1 (CH), 76.3, 129.2, 131.6, 139.1, 139.2 (C); $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{IN}$ (319.15); CHN: ber. C 52.69, H 3.16, N 4.39, gef. C 53.04, H 3.07, N 4.16 (Einfachbestimmung); MS (EI): m/z (%) = 319 $[\text{M}]^{+\bullet}$ (100), 192 $[\text{M}^{+\bullet}-127]$ (20); HPLC (Gradient): 99.3 % bei 254 nm, t_{ms} = 14.4 min, t_{m} = 1.2 min (System 2).

7-Methyl-2-phenyl-1H-indol (29d)

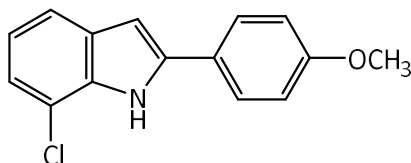
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-methylphenyl)-2-chlorethanon (**24d**, 725 mg, 3.95 mmol) und Phenylmagnesiumbromid (1.0 M in 2-Methyltetrahydrofuran, 10.0 mL, 10.0 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 20 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3 x 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (25 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels wurden 423 mg (52 %) eines brauen Pulvers erhalten.

Schmp.: 117–119 °C (Lit. ¹⁴¹: 117 °C); IR (KBr): 3448 cm⁻¹ (NH); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 2.55 (s, 3H, CH₃), 6.84 – 6.98 (m, 3H, ArH), 7.26 – 7.41 (m, 2H, ArH), 7.41 – 7.51 (m, 2H, ArH), 7.51 – 8.55 (m, 2H, ArH), 11.06 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 17.2 (CH₃), 99.5, 117.6, 119.6, 122.2, 125.4 (2C), 127.3, 128.6 (2C) (CH), 120.7, 128.3, 132.3, 136.6, 137.7 (C) Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein¹³⁹; C₁₅H₁₃N (207.28); MS (APCI): *m/z* (%) = 208 [M+H]⁺ (100).

7-Chlor-2-(4-chlorphenyl)-1*H*-indol (**29e**)

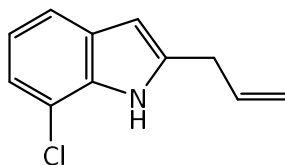
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-chlorphenyl)-2-chlorethanon (**24a**, 404 mg, 1.98 mmol) und 4-Chlorphenylmagnesiumbromid (1.0 M in Methyltetrahydrofuran, 5.0 mL, 5.0 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 15 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3x10 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (3x25 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 10:1) aufgereinigt. Es wurden 232 mg (45 %) schwach gelbliche Kristalle erhalten.

Smp.: 125–127 °C; IR (KBr): 3416 cm⁻¹ (NH); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 6.95 – 7.09 (m, 2H, ArH), 7.19 (dd, 1H, *J* = 7.5/1.0 Hz, ArH), 7.37 – 7.59 (m, 3H, ArH), 7.92 – 8.09 (m, 2H, ArH), 11.61 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 100.9, 119.1, 120.6, 121.5, 127.6 (2C), 128.7 (2C) (CH), 115.8, 130.4, 130.5, 132.3, 134.2, 138.1 (C); C₁₄H₉Cl₂N (262.13); CHN: ber. C 64.12, H 3.46, N 5.34, gef. C 64.08, H 3.43, N 5.27; MS (EI): *m/z* (%) = 261 [M]⁺• (100), 226 [M⁺•-35] (11), 191 [M⁺•-70] (11); HPLC (Gradient): 99.7 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 14.6 min, *t*_m = 1.2 min (System 2).

7-Chlor-2-(4-methoxyphenyl)-1*H*-indol (29f)

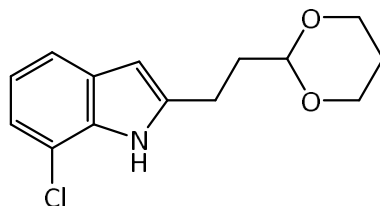
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-chlorphenyl)-2-chlorethanon (**24a**, 401 mg, 1.97 mmol) und 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1.0 M in Tetrahydrofuran, 5.0 mL, 5.0 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 15 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3x10 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Natriumchloridlösung (3x25 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 10:1) aufgereinigt. Es wurden 351 mg (69 %) eines gelblichen Pulvers erhalten.

Smp.: 102–104 °C; IR (KBr): 3367 cm⁻¹ (NH); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 3.82 (s, 3H, CH₃), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H-3), 6.94 – 7.08 (m, 3H, ArH), 7.13 (dd, 1H, *J* = 7.6/0.9 Hz, ArH), 7.47 (dt, 1H, *J* = 8.0/0.9 Hz, ArH), 7.88 – 7.97 (m, 2H, ArH), 11.43 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 55.2 (CH₃), 99.0, 114.1 (2C), 118.6, 120.3, 120.7, 127.3 (2C) (CH), 115.5, 124.2, 130.7, 133.8, 139.6, 159.1 (C); C₁₅H₁₂ClNO (257.72); CHN: ber. C 69.91, H 4.69, N 5.44, gef. C 69.68, H 4.62, N 5.26; MS (EI): *m/z* (%) = 257 [M]⁺• (100), 242 [M⁺•-15] (65); HPLC (Gradient): 97.6 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 13.7 min, *t*_m = 1.2 min (System 2).

2-Allyl-7-chlor-1H-indol (29g)¹¹²

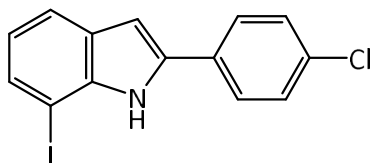
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-chlorphenyl)-2-chlorethanon (**24a**, 425 mg, 2.08 mmol) und Allylmagnesiumbromid (1.0 M in Diethylether, 6.0 mL, 6.0 mmol) in getrocknetem Toluol (10 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 15 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3x15 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 8:1) aufgereinigt. Es wurden 195 mg (49 %) eines gelben Öls erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 3.52 (dq, 2H, J = 6.7/1.3 Hz), 5.08 – 5.22 (m, 2H), 5.76 – 6.21 (m, 1H), 6.24 (dt, 1H, J = 0.96/2.06 Hz, ArH), 6.94 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-5), 7.07 (dd, 1H, J = 7.7/0.9 Hz, ArH), 7.39 (dt, 1H, J = 7.8/1.0 Hz, ArH), 11.26 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 31.9, 116.5 (CH₂), 99.9, 118.2, 119.67, 119.70, 135.3 (CH), 115.1, 130.2, 132.8, 139.7 (C) Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein¹¹²; C₁₁H₁₀ClN (191.66).

7-Chlor-2-(2-(1,3-dioxan-2-yl)ethyl)-1*H*-indol (29h)¹¹²

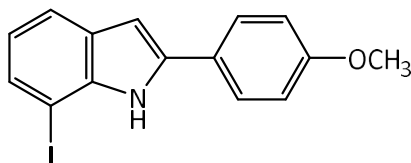
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-chlorphenyl)-2-chlorethanon (**24a**, 501 mg, 2.46 mmol) und 2-(1,3-Dioxan-2-yl)ethylmagnesiumbromid (0.5 M in Tetrahydrofuran, 13.0 mL, 6.5 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (10 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 20 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3x15 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (3x25 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 2:1) aufgereinigt. Es wurden 393 mg (60 %) eines gelben Pulvers erhalten.

Smp.: 111–112 °C (Lit. ¹¹²: hellgelbes Öl); IR (KBr): 3279 cm⁻¹ (NH); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 1.34 (dt, 1H, *J* = 13.4/2.6/1.4 Hz), 1.78 – 1.99 (m, 3H), 2.74 – 2.83 (m, 2H), 3.64 – 3.75 (m, 2H), 3.98 – 4.06 (m, 2H), 4.57 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz), 6.24 (dt, 1H, *J* = 1.9/0.8 Hz, ArH), 6.93 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-5), 7.06 (dd, 1H, *J* = 7.7/0.9 Hz, H-6), 7.38 (dt, 1H, *J* = 7.8/0.8 Hz, ArH), 11.20 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 22.1, 25.4, 34.1, 66.0 (2C) (CH₂), 99.4, 100.6, 118.10, 119.57, 119.61 (CH), 115.0, 130.2, 132.8, 141.4 (C); C₁₄H₁₆ClNO₂ (265.74).

7-Iod-2-(4-chlorphenyl)-1H-indol (29i)

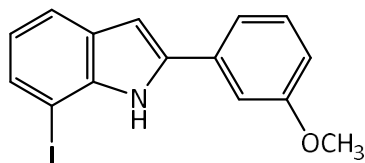
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-iodphenyl)-2-chlorethanon (**24c**, 280 mg, 0.948 mmol) und 4-Chlorphenylmagnesiumbromid (1.0 M in Methyltetrahydrofuran, 3.8 mL, 3.8 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 15 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3x10 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (25 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 5:1) aufgereinigt. Es wurden 76 mg (23 %) eines gelben Pulvers erhalten.

Smp.: 121–123 °C; IR (KBr): 3413 cm^{-1} (NH); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 6.83 (t, 1H, J = 7.6 Hz, H-5), 7.08 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-3), 7.33 – 7.81 (m, 4H, ArH), 7.90 – 8.08 (m, 2H, ArH), 11.09 (d, 1H, J = 2.0 Hz, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 101.4, 120.2, 121.6, 127.9 (2C), 128.6 (2C), 131.4 (CH), 76.4, 129.2, 130.5, 132.3, 137.9, 139.2 (C); $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClIN}$ (353.59); MS (APCI): m/z (%) = 354 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100); HPLC (Gradient): 98.1 % bei 254 nm, t_{ms} = 15.4 min, t_{m} = 1.2 min (System 2).

7-Iod-2-(4-methoxyphenyl)-1H-indol (29j)

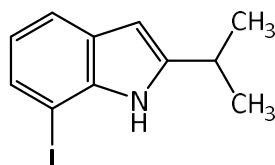
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-iodphenyl)-2-chlorethanon (**24c**, 310 mg, 1.05 mmol) und 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1.0 M in Tetrahydrofuran, 3.0 mL, 3.0 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 15 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3x10 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (25 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: *n*-Hexan-Ethylacetat 10:1) aufgereinigt. Es wurden 80 mg (22 %) bräunliche Kristalle erhalten.

Smp.: 106–111 °C; IR (KBr): 3438 cm⁻¹ (NH); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 3.82 (s, 3H, CH₃), 6.80 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-5), 6.90 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H-3), 6.95 – 7.08 (m, 2H, ArH), 7.48 (dd, 1H, *J* = 7.4/0.9 Hz, ArH), 7.50 – 7.54 (m, 1H, ArH), 7.86 – 7.96 (m, 2H, ArH), 10.91 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 55.2 (CH₃), 99.5, 114.0 (2C), 119.7, 121.3, 127.6 (2C), 130.5 (CH), 76.1, 124.2, 129.5, 138.9, 139.3, 159.1 (C); CHN: ber. C 51.60, H 3.46, N 4.01, gef. C 52.06, H 3.37, N 3.86; C₁₅H₁₂INO (349.17); MS (APCI): *m/z* (%) = 350 [M+H]⁺ (100); HPLC (Gradient): 98.7 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 14.3 min, *t*_m = 1.2 min (System 2).

7-Iod-2-(3-methoxyphenyl)-1H-indol (29k)

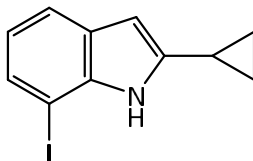
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-iodphenyl)-2-chlorethanon (**24c**, 354 mg, 1.20 mmol) und 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1.0 M in THF/Toluen, 3.0 mL, 3.0 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (7 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 20 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3 x 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: *n*-Hexan-Ethylacetat 3:1) aufgereinigt. Es wurden 245 mg (58 %) eines gelb-orangen Öls erhalten, das ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet wurde.

IR (NaCl): 3442 cm^{-1} (NH); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 3.86 (s, 3H, CH_3), 6.82 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 6.92 (ddd, 1H, $J = 8.1/2.6/1.1$ Hz, ArH), 7.06 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, ArH), 7.37 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 7.48 – 7.59 (m, 4H, ArH), 10.85 – 11.16 (m, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 55.3 (CH_3), 101.2, 111.6, 113.5, 118.6, 120.1, 121.4, 129.6, 131.2 (CH), 76.3, 129.2, 132.9, 139.01, 139.03, 159.5 (C); $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{INO}$ (349.17); MS (APCI): m/z (%) = 350 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 223 $[\text{M}-126]^+$ (89); HPLC (isokr.): 91.3 % bei 254 nm und 93.2 % bei 280 nm, $t_{\text{ms}} = 5.1$ min, $t_{\text{m}} = 1.1$ min (ACN/ H_2O 70:30) (System 3); HPLC (Gradient): 93.3 % bei 254 nm, $t_{\text{ms}} = 13.5$ min, $t_{\text{m}} = 1.2$ min (System 3); λ_{max} : 307 nm.

7-Iod-2-isopropyl-1H-indol (29l)

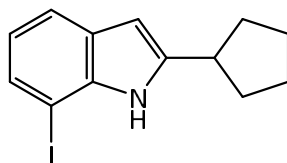
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-iodphenyl)-2-chlorethanon (**24c**, 350 mg, 1.18 mmol) und Isopropylmagnesiumchlorid (2.0 M in THF, 1.5 mL, 3.0 mmol) in getrocknetem THF (10 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 20 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (4x20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (30 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 8:1) aufgereinigt. Es wurden 109 mg (32 %) eines rot-braunen Öls erhalten, das ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet wurde.

IR (NaCl): 3423 cm^{-1} (NH), 2869, 2925, 2961 cm^{-1} (aliph. C-H); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 1.29 (d, 6H, J = 7.0 Hz, 2xCH₃), 3.12 (sept, 1H, J = 7.0/0.8 Hz, CH), 6.28 (dd, 1H, J = 2.1/0.9 Hz, ArH), 6.74 (t, 1H, J = 7.7, H-5), 7.38 (dd, 1H, J = 7.4/0.9 Hz, ArH), 7.43 (dt, 1H, J = 7.7/0.9 Hz, ArH), 10.71 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 22.5 (2C) (CH₃), 26.9, 97.3, 119.3, 120.5, 129.1 (CH), 75.9, 128.7, 137.7, 148.1 (C); C₁₁H₁₂IN (285.13); MS (APCI): m/z (%) = 286 [M+H]⁺ (93), 270 [M-15]⁺ (30), 159 [M-126]⁺ (100), 144 [M-141]⁺ (89), 117 [M-168]⁺ (25).

2-Cyclopropyl-7-iod-1*H*-indol (29m)

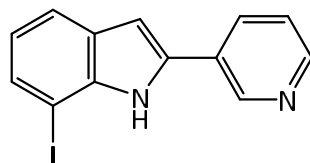
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-iodphenyl)-2-chlorethanon (**24c**, 500 mg, 1.69 mmol) und Cyclopropylmagnesiumbromid (0.5 M in THF, 9.0 mL, 4.5 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 20 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3 x 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (30 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 4:1) aufgereinigt. Es wurden 132 mg (28 %) eines orangen Öls erhalten.

IR (NaCl): 3421 cm^{-1} (NH); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 0.68 – 0.80 (m, 2H, CH₂), 0.90 – 1.04 (m, 2H, CH₂), 2.07 – 2.16 (m, 1H, CH), 6.10 (dd, 1H, $J = 2.0/0.6\text{ Hz}$, ArH), 6.70 – 6.75 (m, 1H, ArH), 7.34 – 7.38 (m, 2H, ArH), 10.91 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 8.65 (2C) (CH₂), 8.62, 95.9, 118.9, 120.7, 128.8 (CH), 75.6, 128.9, 137.6, 144.3 (C); C₁₁H₁₀I (283.11); CHN: ber. C 46.67, H 3.56, N 4.95, gef. C 46.55, H 3.63, N 4.77; MS (APCI): m/z (%) = 284 [M+H]⁺ (100), 157 [M-126]⁺ (54).

2-Cyclopentyl-7-iod-1H-indol (29n)

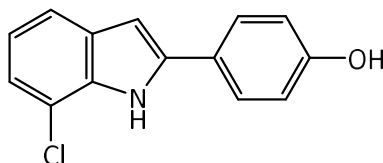
Nach AAV 5 aus 1-(2-Amino-3-iodphenyl)-2-chlorethanon (**24c**, 400 mg, 1.35 mmol) und Cyclopentylmagnesiumbromid (2.0 M in Diethylether, 4.0 mL, 8.0 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (10 mL). Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 20 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (3 x 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchloridlösung (30 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 5:1) aufgereinigt. Es wurden 122 mg (29 %) eines gelben Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.59 – 1.70 (m, 4H, aliph. H), 1.72 – 1.79 (m, 2H, aliph. H), 2.02 – 2.10 (m, 2H, aliph. H), 3.19 – 3.26 (m, 1H, CH), 6.31 (dd, 1H, $J = 2.1/0.9$ Hz, ArH), 6.73 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-5), 7.38 (dd, 1H, $J = 7.5/1.0$ Hz, ArH), 7.41 (dt, 1H, $J = 7.8/0.9$ Hz, ArH), 10.73 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 24.8 (2C), 32.8 (2C) (CH_2), 38.2, 97.8, 119.2, 120.6, 129.1 (CH), 75.9, 128.7, 137.8, 145.8 (C); $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{IN}$ (311.17); CHN: ber. C 50.18, H 4.54, N 4.50, gef. C 50.56, H 4.18, N 4.17 (Einfachbestimmung); MS (APCI): m/z (%) = 312 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 185 $[\text{M}-126]^+$ (19); HPLC (isokr.): 99.3 % bei 254 nm und 99.6 % bei 280 nm, $t_{\text{ms}} = 6.6$ min, $t_{\text{m}} = 1.1$ min (ACN/ H_2O 70:30) (System 3); HPLC (Gradient): 99.0 % bei 254 nm, $t_{\text{ms}} = 14.1$ min, $t_{\text{m}} = 1.2$ min (System 3); λ_{max} : 237, 256 und 272 nm.

7-Iod-2-(pyridin-3-yl)-1H-indol (29o)

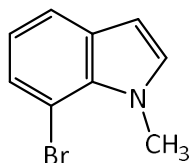
Unter Stickstoffatmosphäre wurde 3-Iodpyridin (615 mg, 3.00 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL) gelöst. Nach der schrittweisen Zugabe von Isopropylmagnesiumchlorid (2.0 M in THF, 1.5 mL, 3.0 mmol) wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 0 °C abgekühlt. 1-(2-Amino-3-iodphenyl)-2-chlorethanon (**24c**, 400 mg, 1.35 mmol) wurde in getrocknetem Tetrahydrofuran (5 mL) gelöst und unter Eiskühlung langsam zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Anschließend wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ammoniumchlorid-Lösung (107 g/L, 20 mL) beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit *tert*-Butylmethylether (5 x 20 mL) extrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (30 mL) gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Ethylacetat-Petrolether 2:1) aufgereinigt. Es wurden 102 mg (24 %) eines gelblichen, kristallinen Feststoffs erhalten, der ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet wurde.

Schmp.: 196–199 °C; IR (KBr): 3435 cm⁻¹ (NH); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 600.1 MHz): δ (ppm) = 6.85 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.16 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, ArH), 7.49 (ddd, 1H, *J* = 8.1/4.8/0.9 Hz, ArH), 7.56 (dd, 1H, *J* = 7.4/1.0 Hz, ArH), 7.59 (dd, 1H, *J* = 7.8/0.8 Hz, ArH), 8.35 (ddd, 1H, *J* = 8.0/2.4/1.6 Hz, ArH), 8.54 (dd, 1H, *J* = 4.7/1.6 Hz, ArH), 9.16 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 11.10 – 11.34 (m, 1H, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 150.9 MHz): δ (ppm) = 101.9, 120.3, 121.7, 123.6, 131.5, 133.4, 147.3, 148.5 (CH), 76.5, 127.6, 129.0, 136.1, 139.4 (C); C₁₃H₉IN₂ (320.13); CHN: ber. C 48.77, H 2.83, N 8.75, gef. C 49.21, H 2.97, N 8.21; MS (APCI): *m/z* (%) = 321 [M+H]⁺ (100), 194 [M-126]⁺ (19); HPLC (Gradient): 98.4 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 14.4 min, *t*_m = 1.2 min (System 2).

7-Chlor-2-(4-hydroxyphenyl)-1H-indol (29p)

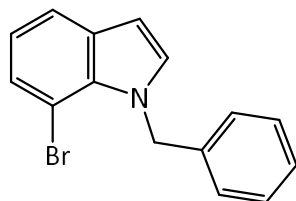
Unter Stickstoffatmosphäre wurde 7-Chlor-2-(4-methoxyphenyl)-1H-indol (**29f**, 301 mg, 1.17 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (10 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde mit einer Spritze über ein Septum Bortribromid (1 M Lösung in Dichlormethan, 10.0 mL, 10.0 mmol) langsam hinzugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Wasser (15 mL) zugesetzt und weitere 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit Ethylacetat (3x10 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 2:1). Es wurden 63 mg (22 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

Smp.: 139–141 °C; IR (KBr): 3431 cm⁻¹ (NH/OH); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 6.79 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H-3), 6.83 – 6.88 (m, 2H, ArH), 6.98 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.11 (dd, 1H, *J* = 7.6/0.9 Hz, ArH), 7.45 (dt, 1H, *J* = 7.9/0.8 Hz, ArH), 7.76 – 7.85 (m, 2H, ArH), 9.68 (s, 1H, OH), 11.35 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, NH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 98.4, 115.5 (2C), 118.4, 120.2, 120.5, 127.4 (2C) (CH), 115.5, 122.7, 130.8, 133.7, 140.1, 157.5 (C); C₁₄H₁₀ClNO (243.69); CHN: ber. C 69.00, H 4.14 N 5.75, gef. C 68.98, H 3.99, N 5.50; MS (EI): *m/z* (%) = 243 [M]⁺ (100), 208 [M⁺-35] (10); HPLC (Gradient): 96.1 % bei 254 nm, *t*_{ms} = 11.2 min, *t*_m = 1.2 min (System 2).

7-Brom-1-methyl-1*H*-indol (35a)

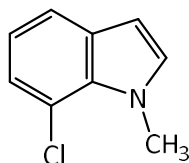
Nach AAV 4 aus Natriumhydrid (198 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 4.95 mmol NaH), 7-Bromindol (586 mg, 2.99 mmol) und Iodmethan (0.25 mL, 568 mg, 4.00 mmol). Der Rückstand wurde aus Ethanol-Wasser 2:1 umkristallisiert und anschließend säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 9:1) aufgereinigt. Es wurden 150 mg (24 %) eines schwach bräunlichen Pulvers erhalten.

Smp.: 49–50 °C (Lit. ¹⁴²: 54–55 °C); IR (KBr): 2919 cm⁻¹; ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 4.11 (s, 3H, CH₃), 6.47 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, ArH), 6.91 (t, 1H, *J* = 11.2 Hz, ArH), 7.30 (dd, 1H, *J* = 2.5/13.9 Hz, ArH), 7.36 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, ArH), 7.55 (dd, 1H, *J* = 1.0/7.9, ArH); C₉H₈BrN (210.07); CHN: ber. C 51.46, H 3.84, N 6.67, gef. C 51.76, H 3.77, N 6.61.

1-Benzyl-7-brom-1*H*-indol (35b)

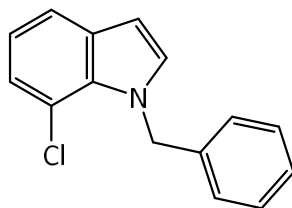
Zu einer eisgekühlten Lösung aus 7-Bromindol (452 mg, 2.31 mmol) in DMF (5 mL) wurde schrittweise Natriumhydrid (123 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 3.08 mmol NaH) zugesetzt. Die Lösung wurde anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und 30 Minuten gerührt. Anschließend wurde wieder auf 0 °C abgekühlt und Benzylbromid (0.3 mL, 2.5 mmol) hinzuge tropft. Anschließend wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat (5 mL) verdünnt und um überschüssiges Natriumhydrid zu entfernen, wurde Methanol (2 mL) zugesetzt. Anschließend wurde vorsichtig Wasser (3 mL) hinzugefügt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3x5 mL) extrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemitel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 10:1) aufgereinigt. Es wurden 300 mg (45 %) bräunliche Kristalle erhalten.

Smp.: 67–68 °C (Lit. ¹⁴²: 60–62 °C); IR (KBr): 1603 cm⁻¹, 1554 cm⁻¹, 1493 cm⁻¹; ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 5.83 (s, 2H, CH₂), 6.62 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, ArH), 6.88 – 7.03 (m, 3H, ArH), 7.15 – 7.39 (m, 4H, ArH), 7.56 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, ArH), 7.61 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.0 Hz, ArH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 50.4 (CH₂), 102.0, 120.5, 120.8, 125.7 (2C), 126.4, 127.0, 128.5 (2C), 132.7 (CH), 103.0, 131.79, 131.81, 139.6 (C); C₁₅H₁₂BrN (286.17); HPLC (Gradient): 96.1 % bei 254 nm, *t*_{m5} = 14.4 min, *t*_m = 1.2 min (System 2).

7-Chlor-1-methyl-1*H*-indol (35c)

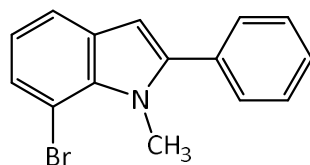
Nach AAV 4 aus Natriumhydrid (238 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 5.95 mmol NaH), 7-Chlorindol (600 mg, 3.96 mmol) und Iodmethan (0.30 mL, 4.7 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 5:1) aufgereinigt. Es wurden 210 mg (32 %) gelbliche Kristalle erhalten.

Smp.: 36–39 °C; IR (KBr): 2922/2853 cm^{-1} (aliph. C-H); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 4.10 (s, 3H, CH_3), 6.48 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, ArH), 6.97 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.08 – 7.19 (m, 1H, ArH), 7.36 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz, ArH), 7.50 (dd, 1H, $J = 7.8/1.0$ Hz, ArH) Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein¹⁴³; $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 36.2 (CH_3), 100.9, 119.8, 120.0, 122.4, 132.6 (CH), 115.8, 131.2, 131.5 (C) ; $\text{C}_9\text{H}_8\text{ClN}$ (165.62).

1-Benzyl-7-chlor-1H-indol (35d)

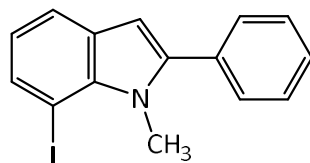
Unter Stickstoffatmosphäre wurde zu einer eisgekühlten Lösung aus 7-Chlorindol (601 mg, 3.96 mmol) in DMF (5 mL) schrittweise Natriumhydrid (240 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 6.00 mmol NaH) zugesetzt. Die Lösung wurde anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und 1 h gerührt. Anschließend wurde wieder auf 0 °C abgekühlt und Benzylbromid (0.50 mL, 4.2 mmol) hinzugetropft. Anschließend wurde für 4.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Methanol (1 mL) beendet und anschließend wurde Wasser (5 mL) hinzugefügt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3x10 mL) extrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 5:1) aufgereinigt. Nach anschließender Umkristallisation aus Ethanol wurden 128 mg (13 %) farblose Kristalle erhalten.

Smp.: 57–59 °C (Lit. ¹⁴⁴: 58–59 °C); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 5.77 (s, 2H, CH₂), 6.62 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, ArH), 6.95 – 6.99 (m, 2H, ArH), 7.01 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-5), 7.11 (dd, 1H, *J* = 7.7/1.1 Hz, H-4/H-6), 7.15 – 7.40 (m, 3H, ArH), 7.53 – 7.62 (m, 2H, ArH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 50.9 (CH₂), 102.1, 119.9, 120.3, 122.9, 125.7 (2C), 127.0, 128.5 (2C), 132.5 (CH), 115.6, 130.7, 131.8, 139.6 (C); C₁₅H₁₂ClN (241.72).

7-Brom-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol (35e)

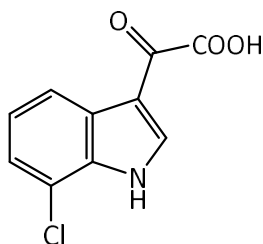
Nach AAV 4 aus Natriumhydrid (151 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 3.78 mmol NaH), 7-Brom-2-phenyl-1*H*-indol (**29b**, 501 mg, 1.84 mmol) und Iodmethan (120 μ L, 1.92 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: n-Hexan – Ethylacetat 15:1). Es wurden 409 mg (78 %) weiße Kristalle erhalten.

Smp.: 66–67 °C; IR (KBr): 2948 cm^{-1} , 1556 cm^{-1} ; ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 3.98 (s, 3H, CH_3), 6.63 (s, 1H, H-3), 6.98 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.38 (dd, 1H, $J = 7.6/1.0$ Hz, ArH), 7.43 – 7.64 (m, 6H, ArH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 34.4 (CH_3), 102.3, 120.0, 121.1, 126.6, 128.4, 128.7 (2C), 129.4 (2C) (CH), 103.5, 130.9, 131.6, 134.4, 143.7 (C); $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{BrN}$ (286.17); MS (APCI): m/z (%) = 286 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 207 $[\text{M}-78]^+$ (81).

7-Iod-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol (35f)

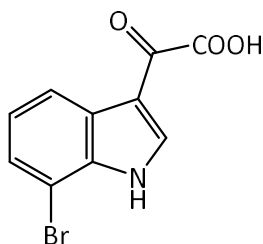
Nach AAV 4 aus Natriumhydrid (90 mg einer 60%igen Dispersion in Mineralöl, entspricht 2.25 mmol NaH), 7-Iod-2-phenyl-1*H*-indol (**29c**, 331 mg, 1.04 mmol) und Iodmethan (0.10 mL, 1.6 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: *n*-Hexan-Ethylacetat 15:1) aufgereinigt. Es wurden 253 mg (73 %) eines gelben Öls erhalten.

IR (NaCl): 3056 cm⁻¹, 2945 cm⁻¹; ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 3.98 (s, 3H, CH₃), 6.56 (s, 1H, H-3), 6.83 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-5), 7.38 – 7.64 (m, 6H, ArH), 7.67 (dd, 1H, *J* = 7.4/1.1 Hz, ArH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 34.7 (CH₃), 102.1, 120.6, 121.7, 128.3, 128.6, 129.4, 133.9 (CH), 74.3, 130.3, 131.7, 137.2, 143.7 (C); C₁₅H₁₂IN (333.17); CHN: ber. C 54.08, H 3.63, N 4.20, gef. C 54.14, H 3.50, N 4.11; MS (APCI): *m/z* (%) = 334 [M+H]⁺ (100), 319 [M-14]⁺ (17), 207 [M-126]⁺ (56).

2-(7-Chlor-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (36a)

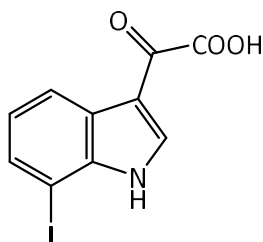
Nach AAV 6 aus 7-Chlorindol (**34a**, 100 mg, 0.660 mmol) und Oxalylchlorid (1 mL, 11.6 mmol) in getrocknetem Diethylether (20 mL). Anschließend wurde in kleinen Schritten gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) hinzugefügt. Zu der klaren Lösung wurde anschließend konz. Salzsäure (5 mL) gegeben. Der dabei entstandene Feststoff wurde abgesaugt und aus Ethanol-Wasser 1:1 umkristallisiert. Es wurden 27 mg (18 %) gelbe, feine Kristalle erhalten.

Smp.: 224–225 °C (Zers.) (Lit¹⁴⁵: 227–228 °C); IR (KBr): 3412, 3244 cm⁻¹ (OH/NH), 1740, 1717 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.29 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.40 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.0 Hz, H-4/H-6), 8.15 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.0 Hz, H-4/H-6), 8.44 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, H-2), 12.76 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, NH), 14.02 (s, 1H, COOH) (Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben der Literatur überein.¹⁴⁵); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 120.0, 123.2, 123.8, 138.3 (CH), 113.2, 116.9, 127.5, 133.5 (C), 164.8 (C=O), 180.9 (C=O); C₁₀H₆ClNO₃ (223.61); CHN: ber. C 53.71, H 2.70, N 6.26; gef. C 53.93, H 2.75, N 5.83; MS (EI): *m/z* (%) = 223 [M]⁺ (18), 178 [M⁺-45] (100), 150⁺ [M-73] (18); HPLC (isokr.): 99.5 % bei 254 nm und 98.4 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 4.7 min, *t*_m = 1.2 min (ACN/Triethylaminpuffer pH 2.6 20:80) (System 1); λ_{max}: 249 nm und 305 nm.

2-(7-Brom-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (36b)

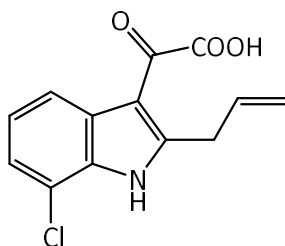
Nach AAV 6 aus 7-Bromindol (**34b**, 100 mg, 0.510 mmol) und Oxalylchlorid (1 mL, 11.7 mmol) in getrocknetem Diethylether (20 mL). Anschließend wurde gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) in kleinen Schritten hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden die Phasen getrennt und die organische Phase noch einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit konzentrierter Salzsäure (5 mL) angesäuert. Der dabei entstandene Feststoff wurde abgesaugt und aus Ethylacetat-*n*-Hexan 1:1 umkristallisiert. Es wurden 78 mg (57 %) eines gelben Pulvers erhalten.

Smp.: 225–226 °C (Zers.); IR (KBr): 3266, 3165 cm⁻¹ (NH/OH), 1749, 1624 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 399.8 MHz): δ (ppm) = 7.23 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.53 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.1 Hz, H-6), 8.20 (dt, 1H, *J* = 8.0/0.8 Hz, H-4), 8.42 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, H-2), 12.60 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, NH), 14.00 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.5 MHz): δ (ppm) = 120.5 (C-4), 124.2 (C-5), 126.3 (C-6), 138.3 (C-2) (CH), 105.1 (C-7), 113.2 (C-3), 127.3 (C-3a), 135.1 (C-7a) (C), 164.7 (COOH), 180.8 (C=O); C₁₀H₆BrNO₃ (268.07); CHN: ber. C 44.81, H 2.26, N 5.23; gef. C 44.83, H 2.10, N 5.17; MS (EI): *m/z* (%) = 267 [M]⁺• (18), 222 [M⁺•-45] (100), 194 [M⁺•-73] (13); HPLC (isokr.): 99.8 % bei 254 nm und 99.7 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 3.1 min, *t*_m = 1.2 min (ACN/Phosphatpuffer pH 6 17:83) (System 1); λ_{max}: 249 nm und 305 nm.

2-(7-Iod-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (36c)

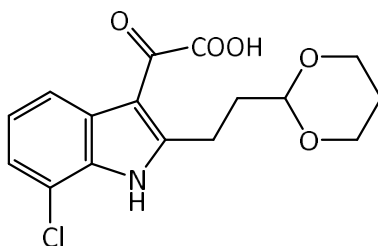
Nach AAV 6 aus 7-Iodindol (**34c**, 125 mg, 0.514 mmol) und Oxalylchlorid (1 mL, 11.7 mmol) in getrocknetem Diethylether (20 mL). Anschließend wurde gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) in kleinen Schritten hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden die Phasen getrennt und die organische Phase noch einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit konzentrierter Salzsäure (5 mL) angesäuert. Der dabei entstandene Feststoff wurde abgesaugt und aus Ethylacetat-*n*-Hexan 1:1 umkristallisiert und anschließend ein zweites Mal aus Petrolether-Ethanol 20:1 umkristallisiert. Es wurden 81 mg (50 %) feine, gelbe Kristalle erhalten.

Smp.: 222–223 °C (Zers.); IR (KBr): 3241 cm⁻¹ (NH/OH), 1745, 1617 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.08 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.71 (dd, 1H, *J* = 7.5/1.0 Hz, H-6), 8.20 (dt, 1H, *J* = 7.6/0.6 Hz, H-4), 8.37 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H-2), 12.30 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, NH), 14.00 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 121.1, 124.5, 132.71, 138.1 (CH), 77.96, 113.2, 126.2, 138.6 (C), 164.7 (COOH), 180.8 (C=O); C₁₀H₆INO₃ (315.07); CHN: ber. C 38.12, H 1.92, N 4.45; gef. C 37.93, H 1.80, N 4.42; MS (EI): *m/z* (%) = 315 [M]⁺• (27), 270 [M⁺•-45] (100), 242 [M⁺•-73] (5); HPLC (isokr.): 99.4 % bei 254 nm und 99.7 % bei 280 nm, *t*_{ms} = 3.0 min, *t*_m = 1.2 min (ACN/Phosphatpuffer pH 6 17:83) (System 1); λ_{max}: 252 nm und 306 nm.

2-(2-Allyl-7-chlor-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (36d)

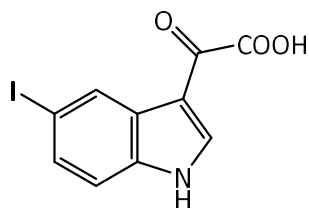
Nach AAV 6 aus 2-Allyl-7-chlor-1*H*-indol (**29g**, 214 mg, 1.12 mmol) und Oxalylchlorid (2.0 mL, 23 mmol) in getrocknetem Diethylether (20 mL). Anschließend wurde vorsichtig gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) zugesetzt. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit verdünnter Natriumhydroxid-Lösung ($w = 8.5\%$, 3x20 mL) extrahiert. Da die wässrige Phase noch sauer reagierte, wurde mit verdünnter Natriumhydroxid-Lösung alkalisiert und mit Diethylether (2x20 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit konz. Salzsäure (15 mL) angesäuert. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und es wurden 245 mg (83 %) eines gelb-braunen Pulvers erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

Smp.: 177–179 °C; IR (KBr): 3229 cm^{-1} (NH), 1720 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 3.83 (dt, 2H, $J = 6.3/1.6$ Hz, CH_2 gesättigt), 4.98 – 5.19 (m, 2H, CH_2 ungesättigt), 5.90 – 6.07 (m, 1H, CH), 7.22 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.33 (dd, 1H, $J = 7.7/1.0$ Hz, H-4/H-6), 7.86 (dd, 1H, $J = 8.1/0.8$ Hz, H-4/H-6), 12.63 (s, 1H, NH), 14.29 (s, 1H, COOH); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 31.1, 117.4 (CH_2), 118.7, 122.6, 123.3, 133.9 (CH), 108.6, 116.3, 128.0, 132.3, 149.5 (C), 167.8 (COOH), 183.5 (C=O); $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$ (263.68); MS (APCI): m/z (%) = 264 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (31), 218 $[\text{M}-45]^+$ (100), 190 $[\text{M}-73]^+$ (18).

2-(7-Chlor-2-(2-(1,3-dioxan-2-yl)ethyl)-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (36e)

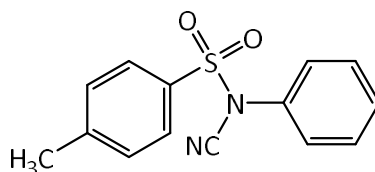
7-Chlor-2-(2-(1,3-dioxan-2-yl)ethyl)-1*H*-indol (**29h**, 102 mg, 0.384 mmol) wurde in getrocknetem Diethylether (20 mL) gelöst. Unter Eiskühlung und Stickstoffatmosphäre wurde eine Lösung von Oxalylchlorid (0.1 mL, 1.16 mmol) in getrocknetem Diethylether (5 mL) langsam hinzuge tropft. Anschließend wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) zugesetzt und 30 min zum Rückfluss erhitzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase einmal mit Diethylether (20 mL) gewaschen. Durch Zugabe von verdünnter Salzsäure (10 mL) fiel ein gelber Niederschlag aus, der abgesaugt wurde. Nach Umkristallisation aus *n*-Hexan – Ethylacetat 5:1 wurden 12 mg (9 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

Smp.: 107–108 °C; IR (KBr): 3247 cm⁻¹ (NH/OH), 2961 cm⁻¹ (aliph. C-H), 1723 cm⁻¹ (C=O), 1687 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 1.36 (dt, 1H, *J* = 13.3/2.5/1.4 Hz), 1.80 – 1.96 (m, 3H), 3.02 – 3.14 (m, 2H), 3.67 – 3.78 (m, 2H), 3.97 – 4.04 (m, 2H), 4.58 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, CH), 7.20 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-5), 7.31 (dd, 1H, *J* = 7.7/0.9 Hz, ArH), 7.83 (dt, 1H, *J* = 8.0/0.7 Hz, ArH), 12.56 (s, 1H, NH), 14.31 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 22.0, 25.4, 34.6, 66.1 (2C) (CH₂), 100.7, 118.6, 122.5, 123.3 (CH), 108.6, 116.3, 128.0, 132.3, 152.1 (C), 168.0 (COOH), 183.6 (C=O); C₁₆H₁₆ClNO₅ (337.76); CHN: ber. C 56.90, H 4.78, N 4.15, gef. C 56.81, H 4.33, N 4.07; MS (APCI): *m/z* (%) = 338 [M+H]⁺ (100), 294 [M-43]⁺ (20), 266 [M-71]⁺ (73).

2-(5-Iod-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoessigsäure (36f)

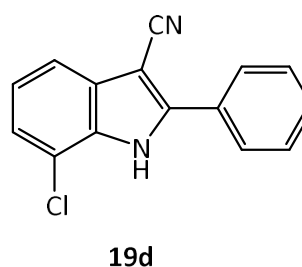
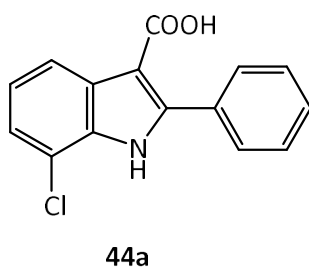
Nach AAV 6 aus 5-Iodindol (**34d**, 399 mg, 1.64 mmol) und Oxalylchlorid (3.0 mL, 35 mmol) in getrocknetem Diethylether (50 mL). Anschließend wurde vorsichtig gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (35 mL) zugesetzt. Um den dabei ausgefallenen Niederschlag in Lösung zu bringen, wurde verdünnte Natriumhydroxidlösung ($w = 8.5\%$, 25 mL) hinzugefügt. Anschließend wurden die Phasen getrennt und die organische Phase noch einmal mit verdünnter Natriumhydroxid-Lösung (30 mL) extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit konz. Salzsäure (10 mL) angesäuert. Der entstandene Niederschlag wurde zunächst aus Ethanol-Aceton (33:2) und ein zweites Mal aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 60 mg (12 %) eines gelben Pulvers erhalten.

Smp.: 258–260 °C (Zers.); IR (KBr): 3161 cm^{-1} (NH), 1715 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.41 (d, 1H, $J = 8.5\text{ Hz}$, H-7), 7.58 (dd, 1H, $J = 8.4/1.7\text{ Hz}$, H-6), 8.43 (d, 1H, $J = 3.3\text{ Hz}$, H-2), 8.52 (d, 1H, $J = 1.7\text{ Hz}$, H-4), 12.45 (d, 1H, $J = 3.1\text{ Hz}$, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 115.0, 129.3, 131.7, 138.5 (CH), 87.3, 111.5, 128.0, 135.8 (C), 164.8 (COOH), 180.7 (C=O); $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{INO}_3$ (315.07); CHN: ber. C 38.12, H 1.92, N 4.45, gef. C 38.45, H 1.91, N 4.12; MS (EI): m/z (%) = 315 [$\text{M}]^{+\bullet}$ (34), 270 [$\text{M}^{+\bullet}-45$] (100), 242 [$\text{M}^{+\bullet}-73$] (3).

N-Cyan-*N*-phenyl-*p*-toluensulfonamid (37)¹²⁰

Phenylharnstoff (5.46 g, 40.1 mmol) wurde in getrocknetem Pyridin (30 mL) gelöst. Unter Stickstoffbegasung wurde unter Rühren und Kühlung im Wasserbad Tosylchlorid (26.4 g, 139 mmol) portionsweise hinzugefügt. Nach Beendigung der Zugabe wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und der Ansatz anschließend unter kräftigem Rühren in eisgekühltes Wasser (200 mL) gegeben. Im Anschluss wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und anschließend mit Ethanol (20 mL) versetzt und für 20 min zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 7.06 g (65 %) weiße Kristalle erhalten.

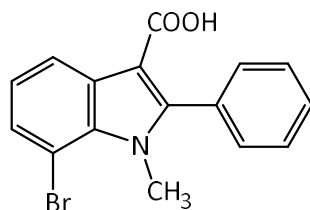
Smp.: 83–85 °C (Lit.¹⁴⁶: 85–87 °C); IR (KBr): 2233 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (d₆-DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 2.45 (s, 3H, CH₃), 7.19 – 7.31 (m, 2H, ArH), 7.43 – 7.61 (m, 5H, ArH), 7.62 – 7.72 (m, 2H, ArH); ¹³C-NMR (d₆-DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 21.2 (CH₃), 126.3 (2C), 128.1 (2C), 130.3 (2C), 130.5, 130.7 (2C) (CH), 108.3, 131.2, 133.7, 147.3 (C); C₁₄H₁₂N₂O₂S (272.32).

7-Chlor-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonsäure (**44a**)

Nach AAV 3 aus 7-Chlor-2-phenyl-1*H*-indol (**29a**, 403 mg, 1.77 mmol) und Chlorsulfonylisocyanat (**38**, 925 μL , 10.6 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 3:1). Es wurden 72 mg (16 %) des Nitrils **19d** und 128 mg (27 %) der Säure **44a** erhalten.

Analytische Daten der Verbindung **44a**:

Schmp.: 205–206 °C; IR (KBr): 3254–2855 cm^{-1} (COOH), 1649 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.18 (t, 1H, J = 7.9 Hz, H-5), 7.29 (dd, 1H, J = 7.6/1.1 Hz, H-4/H-6), 7.43 – 7.54 (m, 3H, ArH), 7.61 – 7.74 (m, 2H, ArH), 8.06 (dd, 1H, J = 8.0/1.1 Hz, H-4/H-6), 12.09 (s, 1H, COOH/NH), 12.26 (s, 1H, COOH/NH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 120.3, 122.0, 122.1, 127.5 (2C), 128.8, 130.5 (2C) (CH), 104.9, 116.1, 129.4, 131.4, 132.5, 145.8 (C), 165.6 (C=O); $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$ (271.70); CHN: ber. C 66.31, H 3.71, N 5.16, gef. C 66.69, H 3.65, N 4.95; MS (APCI): m/z (%) = m/z (%) = 272 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (98), 254 $[\text{M}-17]^+$ (100), 228 $[\text{M}-43]^+$ (45); HPLC (isokr.): 99.8 % bei 254 nm und 99.9 % bei 280 nm, t_{ms} = 3.92 min, t_{m} = 1.06 min (ACN/Phosphatpuffer pH 7.0 25:75) (System 1); HPLC (Gradient): 95.9 % bei 254 nm, t_{ms} = 10.15 min, t_{m} = 1.1 min (System 3); λ_{max} : 240 und 301 nm.

7-Brom-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-3-carbonsäure (**44b**)

Nach AAV 3 aus 7-Brom-1-methyl-2-phenyl-1*H*-indol (**35e**, 252 mg, 0.881 mmol) und Chlorsulfonylisocyanat (**38**, 460 μL , 5.28 mmol). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Fließmittel: Petrolether-Ethylacetat 2:1). Es wurden 116 mg (40 %) bräunliche Kristalle der Säure **44b** erhalten. Das entsprechende Indol-3-carbonitril konnte nur in Spuren nachgewiesen werden.

Schmp.: 210–213 °C; IR (KBr): 3500–2250 cm^{-1} (OH), 1658 cm^{-1} (C=O), 1600 cm^{-1} (arom. C-C); ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 400.4 MHz): δ (ppm) = 3.80 (s, 3H, CH_3), 7.13 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-5), 7.40 – 7.58 (m, 6H, ArH), 8.21 (dd, 1H, J = 8.0/1.0 Hz, ArH), 11.94 (s, 1H, COOH); ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 100.7 MHz): δ (ppm) = 34.3 (CH_3), 121.0, 122.8, 127.8, 128.0 (2C), 129.0, 130.5 (2C) (CH), 103.6, 105.3, 129.8, 131.1, 132.8, 148.2 (C), 165.0 (C=O); $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrNO}_2$ (330.18); CHN: ber. C 58.20, H 3.66, N 4.24, gef. C 58.47, H 3.90, N 4.07; MS (APCI): m/z (%) = 330 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (75), 312 $[\text{M}-17]^+$ (34), 286 $[\text{M}-43]^+$ (50), 251 $[\text{M}-78]^+$ (100), 207 $[\text{M}-122]^+$ (56); HPLC (isokr.): 99.5 % bei 254 nm und 99.6 % bei 280 nm, t_{ms} = 3.72 min, t_{m} = 1.06 min (ACN/Phosphatpuffer pH 7.0 40:60) (System 1); HPLC (Gradient): 96.9 % bei 254 nm, t_{ms} = 12.6 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 237 und 298 nm.

8.3 Molekulares *docking*

Für die *docking*-Untersuchungen wurden in der PDB-Datenbank frei verfügbare Proteinkristallstrukturen der Kinasen verwendet, die zunächst als *pdb*-Datei gespeichert wurden. Zur Vorbereitung des *dockings* wurden diese Kristallstrukturen mit der in MOE¹⁴⁷ (Version 2013.0801) integrierten Funktion LigX präpariert. Dabei wird die Proteinstruktur unter anderem protoniert, Wassermoleküle außerhalb der Bindetasche entfernt und die Ausrichtung der Seitenketten von Asparagin, Glutamin und Histidin optimiert. Abschließend wird eine Energieminimierung durchgeführt und die Strukturen wurden als *mol2*-Datei gespeichert. Auch die zu untersuchenden Liganden wurden mit MOE erstellt, energieminimiert und als *mol2*-Datei gespeichert. Die *docking*-Studien wurden mit GOLD¹⁰⁶ durchgeführt, das über die Benutzeroberfläche HERMES (Version 1.6.2) gesteuert wurde. Für die Voreinstellung des *dockings* wurde die Funktion *wizard* genutzt, die durch alle nötigen Schritte führt. Zunächst wurde die vorbereitete *mol2*-Datei des Proteins geladen und fehlende Protonen ergänzt. Außerdem wurden alle Liganden und Wassermoleküle gelöscht. Für die Untersuchungen in der Struktur 4YLJ¹⁰² von DYRK1A wurde das Wassermolekül HOH683 in der Struktur belassen, da es in die Ligand-Protein-Interaktionen eingebunden ist. Als Bindetasche wurde ein Bereich von 10 Å um den Originalliganden herum definiert. Für die Bewertung der erhaltenen Posen und das *ranking* der Ergebnisse wurde die in GOLD enthaltene *chemscore* Funktion in Kombination mit dem speziellen *kinase template* verwendet. Die *search efficiency* wurde auf 200 % gesetzt und für jede Verbindungen wurden 10 GA *runs* durchgeführt. Die Funktion „*generate diverse solutions*“ wurde aktiviert und „*allow early termination*“ deaktiviert. Die Untersuchungen wurden ohne das Setzen von *constraints* durchgeführt. Für das verbliebene Wassermolekül HOH683 wurden die Optionen „*toggle*“ und „*spin*“ festgelegt. Die Ergebnisse der *docking*-Studien wurden mit USCF Chimera¹⁴⁸ (Version 1.11.2) ausgewertet und visualisiert.

8.4 Proteinkinaseassays

Die Enzymassays zur Bestimmung der Kinaseinhibition an CLK1–4, DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, GSK-3β, CK1, CDK2, CDK5 und CDK9 wurden von ManRos Therapeutics in Roscoff (Frankreich) durchgeführt. Die Kinaseaktivität wurde in Puffer A (10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 µg Heparin/mL) oder Puffer B (60 mM β-

Glycerinphosphat, 15 mM *p*-Nitrophenylphosphat, 25 mM 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (pH 7.2), 15 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM Natriumvanadat, 1 mM Phenylphosphat) bei 30 °C und einer ATP-Konzentration von 15 µmol/L bestimmt. Als Substrate wurden die Peptide GS-1, RS, CKS, Histon H1 und CDK7/9 *tide* verwendet (Fa. Proteogenix, Oberhausbergen, Frankreich). Zur Bestimmung der Kinaseaktivität wurde die Übertragung eines [γ-³³P]-Phosphats von radioaktiv markiertem [γ-³³P]-ATP auf das Substrat radiometrisch vermessen. Dazu wurden die Testverbindungen gelöst in DMSO zu einer Pufferlösung gegeben, die das Enzym, das entsprechende Substrat und [γ-³³P]-ATP enthielt. Es wurde 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt, indem 25 µL der überstehenden Lösung mit dem FilterMate Harvester (Packard) auf P81 Phosphocellulosepapier (Whatman) gegeben wurden, das fünfmal mit 1%iger Phosphorsäure gewaschen wurde. Nach Zusatz von 1 mL der ACS Szintillationsflüssigkeit (Amersham) zu den noch feuchten Papieren, wurden die Radioaktivität mit einem Packard Counter bestimmt. Die gemessene Radioaktivität verhält sich linear zum eingebauten [γ-³³P]-Phosphat, sodass daraus die Kinaseaktivität ermittelt werden kann. Zusätzlich zu den Proben wurden Blindwerte ohne Enzym bestimmt, die von der gemessenen Kinaseaktivität abgezogen wurden. Die Aktivität wurde als maximale Aktivität im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO ausgedrückt. Zur Ermittlung der IC₅₀-Werte wurden mehrere Verdünnungen der Testsubstanzen vermessen, um eine Dosis-Wirkungs-Kurve zu erhalten. Von jeder Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, wobei die Standardabweichung unter 10 % lag.^{74, 149}

GSK-3β

GSK-3β wurde aus Schweinehirn isoliert und mittels Affinitätschromatographie an Agarose-gebundenem Axin-His6 aufgereinigt.¹⁵⁰ Die Aktivität wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µL des Puffer A unter Zusatz von 0.5 mg BSA/mL und 1 mM DTT bestimmt. Zusätzlich wurden 1 mg/mL des GSK-3 spezifischen Substrats GS-1 (YRRAAVPPÄSPSLSRHSSPHQpSEDEE-E, pS = phosphoryliertes Serin) und 15 µmol/L [γ-³³P]-ATP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/mL) zugesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation wurde ein Aliquot wie oben beschrieben vermessen.¹⁰²

CLK1–4 und DYRK1A, 1B, 2 und 3

Die murinen CLK1–4 wurden in *Escherichia coli* als rekombinante GST-Fusionsproteine exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose. Die humanen DYRK1A, 1B, 2 und 3 wurden als rekombinante GST-Fusionsproteine in *Esche-*

richia coli exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose aufgereinigt. Die Aktivität der CLK- und DYRK-Kinasen wurde wie für GSK-3 β beschrieben in Puffer A unter Zusatz von 0.15 mg BSA/mL und 1 mM DTT sowie 1 μ g des Peptids RS (GRSRSRSRSR) als Substrat bestimmt.

CK1

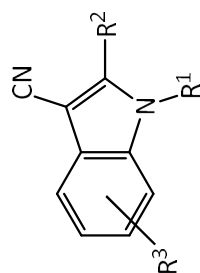
CK1 wurde aus Schweinehirn isoliert und mittels Affinitätschromatographie an Agarose mit immobilisiertem GST-Axin aufgereinigt. Die Aktivität wurde in einem Gesamtvolumen von 30 μ L des Puffer B bestimmt. Es wurden 15 μ mol/L [γ -³³P]-ATP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/mL) und 25 μ M des CK1 spezifischen Substrats CKS Peptide (RRKHAAIGpSAYSITA) zugesetzt.¹⁵¹

CDK2/CDK5

CDK2 wurde mit dem komplexierten Cyclin A und CDK5 mit dem komplexierten p25 aus gleichen Teilen von rekombinanter CDK5 und p25 bzw. CDK2 und Cyclin A hergestellt, die in *Escherichia coli* als Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine exprimiert wurden. Die Aufreinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose. Die Kinaseaktivität wurde in einem Gesamtvolumen von 30 μ L des Puffer A bestimmt. Es wurden 15 μ mol/L [γ -³³P]-ATP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/mL) und 1 mg/mL des Substrats Histon H1 zugesetzt.^{102, 152}

CDK9

CDK9 und das komplexierte Cyclin T wurden als rekombinante, humane Proteine in Insektenzellen exprimiert. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte wie für CDK2/CDK5 beschrieben, allerdings wurde CDK7/9 *tide* (YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (8.1 μ g/Assay) als Substrat verwendet.¹⁰²

Tabelle 8-1: Bestimmung der kinaseinhibitorischen Aktivität der Indol-3-carbonitrile **19**, **20** und **21** an ausgewählten Kinasen der CMGC-Gruppe.^a**19, 20, 21**

	R ¹	R ²	R ³	DYRK 1A	DYRK 1B	DYRK 2	DYRK 3	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	GSK- 3	CK1	CDK2	CDK5	CDK9
19a	H	H	7-Cl	3.3	>10	>10	>10	3.33	>10	>10	>10	>10	84%	n.b.	76%	n.b.
19b	H	H	7-Br	1.1	5.9	>10	>10	2.9	>10	>10	4	>10	79%	n.b.	60%	n.b.
19c	H	H	7-I	0.410	1.8	8	>10	1.9	8	>10	1.8	>10	71%	n.b.	35%	n.b.
19d	H	Phenyl	7-Cl	0.040	>10	>10	>10	0.070	>10	>10	0.120	>10	88%	n.b.	85%	n.b.
19e	H	Phenyl	7-Br	0.025	0.120	>10	>10	0.067	0.433	>10	0.033	-	100%	137%	144%	88%
19f	H	Phenyl	7-I	0.010	0.570	>10	>10	0.080	2	>10	0.050	>10	84%	n.b.	75%	n.b.
19g	H	4-H ₃ CO-Phenyl	7-I	0.233	>10	>10	>10	0.333	>10	>10	0.220	-	95%	115%	162%	117%
19h	H	3-H ₃ CO-Phenyl	7-I	0.210	0.633	>10	>10	0.633	3.3	>10	0.290	-	98%	136%	116%	101%
19i	H	Cyclopentyl	7-I	0.07	0.6	-	-	0.12	1	-	0.1	>10	>10	n.b.	n.b.	n.b.

Fortsetzung Tabelle 8-1: Bestimmung der kinaseinhibitorischen Aktivität der Indol-3-carbonitrile **19**, **20** und **21** an ausgewählten Kinasen der CMGC-Gruppe.^a

	R ¹	R ²	R ³	DYRK 1A	DYRK 1B	DYRK 2	DYRK 3	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	GSK- 3	CK1	CDK2	CDK5	CDK9
19j	H	Isopropyl	7-I	0.28	0.53	>10	>10	0.1	0.7	>10	0.1	1.3	>10	n.b.	n.b.	n.b.
19k	H	Cyclopropyl	7-I	0.14	0.5	8	>10	0.110	1	-	0.1	-	>10	n.b.	n.b.	n.b.
19l	H	Allyl	7-Cl	0.690	1.3	>10	>10	0.533	1.3	>10	0.533	-	70%	71%	89%	29%
19m	H	2-(1,3-Dioxan-2-yl)ethyl	7-Cl	3.9	>10	>10	>10	4.9	>10	>10	4	-	92%	84%	107%	104%
19n	H	H	5-I	1.3	2	10	>10	10	-	-	>10	0.53	>10	n.b.	n.b.	n.b.
19o	H	Phenyl	7-CH ₃	35%	74%	75%	-	56%	75%	-	43%	-	96%	98%	92%	88%
19p	H	4-H ₃ CO-Phenyl	7-Cl	60%	n.b.	n.b.	n.b.	47%	n.b.	n.b.	n.b.	118%	94%	n.b.	94%	n.b.
19q	H	4-Cl-Phenyl	7-Cl	60%	n.b.	n.b.	n.b.	68%	n.b.	n.b.	n.b.	96%	85%	n.b.	89%	n.b.
19r	H	4-Cl-Phenyl	7-I	42%	79%	116%	101%	55%	92%	130%	36%	112%	102%	104%	69%	103%
19s	H	Pyridin-3-yl	7-I	0.08	0.3	-	-	0.200	>10	-	>10	-	>10	n.b.	n.b.	n.b.
19t	H	Phenyl	H	0.4	6	-	-	0.800	>10	-	2	-	>10	n.b.	n.b.	n.b.
19v	H	4-OH-Phenyl	7-Cl	0.1	0.8	3	-	0.08	0.32	8	0.07	0.3	>10	n.b.	n.b.	n.b.

Fortsetzung Tabelle 8-1: Bestimmung der kinaseinhibitorischen Aktivität der Indol-3-carbonitrile **19**, **20** und **21** an ausgewählten Kinasen der CMGC-Gruppe.^a

	R ¹	R ²	R ³	DYRK 1A	DYRK 1B	DYRK 2	DYRK 3	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	GSK- 3	CK1	CDK2	CDK5	CDK9
20a	CH ₃	H	7-Br	1.9	>10	>10	>10	3.33	>10	>10	>10	>10	92%	n.b.	72%	n.b.
20b	Benzyl	H	7-Br	81%	n.b.	n.b.	n.b.	53%	n.b.	n.b.	n.b.	114%	84%	n.b.	93%	n.b.
20c	CH ₃	H	7-Cl	32%	47%	117%	95%	56%	70%	97%	30%	182%	96%	117%	107%	69%
20d	Benzyl	H	7-Cl	97%	78%	144%	95%	102%	95%	127%	84%	156%	95%	131%	122%	128%
20e	CH ₃	Phenyl	7-Br	2.3	10	-	-	>10	-	-	1	-	>10	n.b.	n.b.	n.b.
20f	CH ₃	Phenyl	7-I	0.65	2.1	-	-	0.6	>10	-	1	-	>10	n.b.	n.b.	n.b.
21	H	2,3-Dihydroxy- propyl	7-Cl	2	4.2	-	-	2	10	-	2	2	>10	n.b.	n.b.	n.b.

^a Die Aktivität ist als IC₅₀-Wert (μM) oder als Restaktivität (%) der Kinase im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach Inkubation mit einer 10 μM Lösung angegeben.

- Die Verbindungen zeigten bei einer Konzentration von 10 μM eine Inhibition < 20 %, sodass kein IC₅₀-Wert bestimmt wurde.

n.b. nicht bestimmt

8.5 Zellbasierte Assays zur Bestimmung der DYRK1A-Inhibition

Die zellbasierten Assays wurden in der Gruppe von Prof. Walter Becker am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der RWTH Aachen durchgeführt. Dazu wurde eine Stammlösung der Testsubstanzen in DMSO hergestellt, die jeweils in den gewünschten Konzentrationen zu den Zellen gegeben wurde. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden HeLa-Zellen in 96 *well*-Platten (20000–30000 Zellen pro *well*) kultiviert und für 3 Tage mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen durch einen Tetrazolium-Assay bestimmt (XTT-Assay, Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland). Der Assay zur Bestimmung der Inhibition der endogenen DYRK1A-Aktivität wurde wie von GÖCKLER *et al.*⁶¹ beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die HeLa-Zellen in 6 *well*-Platten ausgesät (80000 Zellen pro *well*) und über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Reagenz FuGENE HD (Promega, Mannheim, Deutschland) mit einem Expressionsvektor für GFP-SF3B1(NT)¹²⁸ (0.5 µg/*well*) transfiziert, um GFP-SF3B1(NT) überexprimierende Zellen zu erhalten. Diese wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen versetzt und für 18 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem SDS-Lysepuffer (200 µL, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 % SDS) lysiert, bei 96 °C denaturiert und mit Ultraschall behandelt. Die Zelllysate wurden mittels Western Blot untersucht. Zur Detektion von pThr343 des SF3B1 wurde ein Kaninchenantikörper¹²⁸ verwendet und GFP wurde mit einem Ziegenantikörper (no. 600-101-215, Fa. Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA) detektiert. Zur Quantifizierung wurden mit Meerrettichperoxidase gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem AIDA Image Analyzer 5.0 Programm (Fa. Raytest, Straubenhardt, Deutschland). Es wurde die relative Phosphorylierung von SF3B1 im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge bestimmt, die durch die GFP-Detektion quantifiziert wurde. Die IC₅₀-Werte wurden durch nicht-lineare Kurvenanpassung mit dem GraphPad Prism 5.0 Programm (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) ermittelt.

8.6 Zytotoxizitätsassay

Die antiproliferative Aktivität der Verbindung **19f** gegenüber der humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT-29 und den Brustadenokarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurde im Arbeitskreis von Prof. Ingo Ott (TU Braunschweig, Deutschland) untersucht. Die Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM; 4.5 g/L D-Glucose, L-Glutamin und Pyruvat) unter Zusatz von Gentamycin (50 mg/L) und fetalem Kälberserum (10

% v/v, FCS superior, Biochrom GmbH, Berlin) kultiviert und einmal wöchentlich passagiert. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde die Zellzahl in den jeweiligen Suspensionen bestimmt und durch Verdünnung mit Medium eine zellspezifische Konzentration eingestellt, die abhängig vom Wachstum der Zellen war (HT-29-Zellen und MCF-7-Zellen: etwa 2500 Zellen/mL; MDA-MB-231-Zellen: etwa 4500 Zellen/mL). Von den entsprechend verdünnten Suspensionen wurden 100 µL in die *wells* einer 96 *well*-Platte pipettiert und diese bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 h (HT-29) bzw. 72 h (MCF-7 und MDA-MB-231) inkubiert. Es wurde eine 100 mM Stammlösung der Verbindung in DMSO und daraus sechs weitere Verdünnungen (50 mM, 20 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0.2 mM) hergestellt, die anschließend 1:1000 mit dem Zellkulturmedium verdünnt wurden, sodass die DMSO-Konzentration in den vermessenen Lösungen 0.1 % betrug. Anschließend wurde das Medium über den Zellen abgesaugt und durch 200 µL des Substanz enthaltenden Mediums ersetzt. Anschließend wurden die Zellen 72 h (HT-29) oder 96 h (MCF-7, MDA-MB-231) mit der Testsubstanz inkubiert. Das überstehende Medium wurde abgesaugt, die noch lebenden Zellen mit Glutaraldehyd-Lösung fixiert und mit Kristallviolettlösung (0.02 %, 100 µL) angefärbt. Nach 30 min wurde die Kristallviolettlösung ausgeschüttet und mit Ethanol 70% (180 µL) versetzt. Das durch die Zellen gebundene Kristallviolett wurde aus den Zellen herausgelöst und die Konzentration durch Absorptionsmessung bei 590 nm im Mikroplattenreader bestimmt. Diese Konzentration ist proportional zur Anzahl der verbleibenden Zellen. Der IC₅₀-Wert gibt die Inhibitorkonzentration an, bei der die Biomasse halbiert wurde. Zur Ermittlung dieses Wertes wurde für jede Konzentration die prozentuale Biomasse im Vergleich zur Kontrolle (T/C_{corr}) nach folgender Formel berechnet:

$$T/C_{\text{corr}} [\%] = 100 \times (T - C_0) / (K - C_0)$$

Dabei ist T die nach der Inkubation bei der jeweiligen Konzentration bestimmte Zellzahl. Jede Konzentration wurde sechsfach getestet und der Mittelwert bestimmt. K ist die Zellzahl der Kontrolle, die unter Zusatz einer DMSO-Kontrolllösung bestimmt wurde. C₀ ist die Zellzahl zu Beginn des Assays vor der Zugabe der Testsubstanz. Wird T/C_{corr} über der Konzentration aufgetragen, kann aus der Kurve der IC₅₀-Wert ermittelt werden. In diesem Fall zeigte die Substanz an keiner Zelllinie eine Proliferationshemmung bei 100 µM, sodass der IC₅₀-Wert mit > 100 µM angegeben wird. Für jede Zelllinie wurden zwei unabhängige Messungen durchgeführt.^{153, 154}

8.7 Vorhersage der physikochemischen Eigenschaften

Die berechneten logP- und logS-Werte wurden mit dem Programm MarvinSketch¹³⁰ (Version 17.13) vorhergesagt. Der logS-Wert ist der dekadische Logarithmus der Löslichkeit S in mol/L, sodass aus dem berechneten logS-Wert die theoretische Löslichkeit S_{calc} berechnet werden konnte. Die Berechnungsmethode des logP-Vorhersagetools beruht auf einer kombinierten Methode aus dem Modell nach KLOPMAN *et al.*¹⁵⁵, einem eigenen Modell von Chem-Axon, das auf der Methode von VISWANDHAN *et al.*¹⁵⁶ basiert, und der PhysProp Datenbank¹⁵⁷. Das *solubility plugin* basiert auf der fragmentbasierten Methode nach Hou *et al.*¹³¹, bei der der Beitrag jedes Atoms zur Löslichkeit der Verbindung betrachtet wird.

8.8 Löslichkeitsuntersuchungen

8.8.1 Thermodynamische Löslichkeit

Die thermodynamische Löslichkeit wurde nach einer im Arbeitskreis entwickelten *shake flask*-Methode¹³² bestimmt. Die Löslichkeit wurde in einem Phosphatpuffer bei pH 7.4 ermittelt. Zur Herstellung des Puffers wurden Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat (298 mg), Kaliumdihydrogenphosphat (19 mg) und Natriumchlorid (800 mg) in bidest. Wasser (100 mL) gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf 7.4 eingestellt. Zur Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit wurden dreimal 500 µg der jeweiligen Testsubstanz in Whatman MiniUniPrep Vials (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) mit 400 µL des Phosphatpuffers versetzt. Die Vials wurden locker mit dem Filteraufsatz verschlossen und, um Verluste des Lösemittels durch Verdunstung zu vermeiden, mit Laborfolie (Parafilm M, Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA) umwickelt. Die Proben wurden für 24 h, 48 h und 72 h bei 25 °C und 400 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Proben visuell auf noch vorhandenen ungelösten Feststoff kontrolliert und dieser abfiltriert. Die Quantifizierung der im Filtrat gelösten Substanz erfolgte mittels isokratischer HPLC mit einer extern erstellten Kalibriergerade. Die Proben wurden mit den in den Synthesevorschriften angegebenen ACN-Wasser-Gemischen vermessen. Die Detektion erfolgte im Absorptionsmaximum der Verbindungen. Wurde nach 24 h und 48 h der gleiche Wert für die Löslichkeit ermittelt, entfiel die Messung nach 72 h. Konnte allerdings nach 72 h noch keine Gleichgewichtseinstellung beobachtet werden, wurde eine weitere Probe für 96 h inkubiert.

Zur Erstellung der Kalibriergerade wurde eine 10 mM Stammlösung der Verbindungen in DMSO hergestellt, aus der durch Verdünnung mit Acetonitril Kalibrierlösungen mit geeigneten Konzentrationen hergestellt wurden. Für jede Kalibriergerade wurden mindestens drei verschiedene Konzentrationen vermessen und die AUC gegen die Konzentration aufgetragen. Konnte bei der Vermessung der Proben kein Signal des DAD beobachtet werden, lag die Löslichkeit unterhalb der Nachweisgrenze der Methode und wurde mit $< 0.5 \mu\text{M}$ angegeben, was der kleinsten bei der Kalibrierung vermessenen Konzentration entspricht.

8.8.2 Kinetische Löslichkeit

Die kinetische Löslichkeit wurde mittels Nephelometrie bestimmt. Dazu wurde eine Stammlösung der Testsubstanzen in DMSO hergestellt. Diese wurde mit DMSO weiter verdünnt, sodass eine Verdünnungsreihe mit 8–12 verschiedenen Konzentrationen erhalten wurde. Jeweils 2 μL dieser DMSO-Lösungen wurden in eine Reihe einer 96 *well*-Platte pipettiert und mit 198 μL des Phosphatpuffers pH 7.4 versetzt, sodass die DMSO-Konzentration in den vermessenen Lösungen 1 % und auch die Probenkonzentration in den vermessenen Lösungen 1/100 der Konzentration in den DMSO-Lösungen betrug. Die 96 *well*-Platte wurde anschließend mit dem Nephelometer vermessen. Dabei war die Laserintensität auf 80 % eingestellt und die Platte wurde vor der Messung mit 500 rpm für 10 s geschüttelt. Zusätzlich wurden drei *wells* mit DMSO-Phosphatpuffer pH 7.4 (2:198) befüllt und als Blindwerte vermessen, die von den Messwerten abgezogen wurden. Bei der nephelometrischen Messung wird die Probe mit einem Laser bestrahlt. Sind ungelöste Feststoffe in der Probe vorhanden, streuen diese das Licht. Die Intensität des Streulichts wird vom Gerät detektiert und ist proportional zur Anzahl der Partikel in der Lösung. Die Intensität des Streulichts wurde über die Konzentration der vermessenen Proben auf der Platte aufgetragen, sodass eine *kick off*-Kurve erhalten wurde. Solange die Probe vollständig löslich ist, wird nur die Streuung auf Blindwertniveau registriert. Sobald die kinetische Löslichkeit überschritten ist, fallen Feststoffpartikel aus, Streulicht wird detektiert und ein konzentrationsabhängiger Anstieg der gemessenen Intensität beobachtet. Die kinetische Löslichkeit kann durch den Schnittpunkt der Geraden, die sich aus den Messwerten unter- und oberhalb der Löslichkeitsgrenze ergeben, berechnet werden. Enthielten bei der Messung alle Proben ausgefallene Partikel oder wurde kein suspendierter Feststoff detektiert, mussten die DMSO-Lösungen entsprechend weiter verdünnt oder neue, konzentriertere Lösungen hergestellt werden. Von jeder Substanz wurden mindestens zwei Verdünnungsreihen aus zwei Einwaagen vermessen.

9 Verzeichnisse

9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Strukturen der 2-substituierten Indole 29 und Reaktionsausbeuten	49
Tabelle 3-2: Strukturen der <i>N</i> -substituierten Indole 35 und der <i>N</i> -methylierten Indol-3-carbonitrile 20g–k	52
Tabelle 3-3: Strukturen der nach Methode A dargestellten Indol-3-carbonitrile 19a–c und 19l–n	54
Tabelle 3-4: Strukturen der nach Methode B synthetisierten Indol-3-carbonitrile 19 und 20	56
Tabelle 3-5: Struktur der nach Methode C synthetisierten Indol-3-carbonitrile 19	59
Tabelle 4-1: IC ₅₀ -Werte (μM) der an Position 1 und 2 unsubstituierten Indol-3-carbonitrile 19a–c und 19n	70
Tabelle 4-2: Kinaseinhibitorische Aktivität der Indol-3-carbonitrile 19 mit einem Phenylsubstituenten in Position 2	72
Tabelle 4-3: Kinaseinhibitorische Aktivität der Indol-3-carbonitrile 19 mit substituierten Phenylresten in Position 2 des Indols.	75
Tabelle 4-4: IC ₅₀ -Werte (μM) der Indol-3-carbonitrile 19 und 21 , die einen aliphatischen Rest an Position 2 des Indols tragen.	76
Tabelle 4-5: Kinaseinhibitorische Aktivität der <i>N</i> -substituierten Indol-3-carbonitrile 20	77
Tabelle 4-6: Zytotoxizität der im SF3B1-Assay untersuchten Verbindungen an HeLa-Zellen .	80
Tabelle 4-7: Zytotoxizität von 19f an drei ausgewählten Krebszelllinien	83
Tabelle 5-1: Berechnung der <i>rule of five</i> -Parameter aller synthetisierten Verbindungen 19 , 20 , 21 , 44 und von KuFal194 (18a)	85
Tabelle 5-2: Berechnung der LLE und LE für die an DYRK1A aktiven Verbindungen 19 , 20 und 21 und Vergleich mit KuFal194 (18a)	88
Tabelle 5-3: Vorhersage und Bestimmung der thermodynamischen und kinetischen Löslichkeit bei pH 7.4 von ausgewählten Indol-3-carbonitrilen und KuFal194 (18a)	94
Tabelle 8-1: Bestimmung der kinaseinhibitorischen Aktivität der Indol-3-carbonitrile 19 , 20 und 21 an ausgewählten Kinasen der CMGC-Gruppe	179

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Aufbau der Proteinkinase DYRK1A mit Kennzeichnung der charakteristischen strukturellen Eigenschaften (PDB: 4NCT).....	5
Abbildung 1-2: Strukturen des DYRK1A-Inhibitors Harmin (1) und des Derivates AnnH75 (2), das keine MAO-A-Inhibition mehr aufweist.....	8
Abbildung 1-3: Struktur von Epigallocatechin-3-gallat (3).....	9
Abbildung 1-4: Strukturen von Lamellarin D (4) und des davon abgeleiteten Chromeno[3,4- <i>b</i>]indol-Derivats 5	9
Abbildung 1-5: Struktur der Meridianin-Derivate 6 und 7	10
Abbildung 1-6: Struktur von Leucettamin B (9) und des daraus abgeleiteten DYRK1A-Inhibitors Leucettin L41 (8)	11
Abbildung 1-7: Strukturen des DYRK1A-Inhibitors INDY (10), des verwandten CLK1-Inhibitors TG003 (11) und des Prodrugs ProINDY (12).....	11
Abbildung 1-8: Struktur von BINDY (13).	12
Abbildung 1-9: Struktur der 3,5-Diaryl-7-azaindole 14 und 15 , die potente Inhibitoren von DYRK1A sind	13
Abbildung 1-10: Struktur des DYRK1A-Inhibitors CX-4945 (16).....	13
Abbildung 1-11: Struktur des bisher potentesten DYRK1A-Inhibitors EHT 5372 (17)	14
Abbildung 1-12: Sequenzvergleich der Aminosäuren von DYRK1A, DYRK1B und CLK1, die an der Ausbildung der ATP-Bindetasche beteiligt sind.....	15
Abbildung 1-13: Vergleich der Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche von DYRK1A (blau, PDB:4YLJ) mit DYRK1B (A, braun, Homologiemodell) und CLK1 (B, pink, 2VAG)	15
Abbildung 1-14: Schematische Darstellung der Halogenbindung zwischen einem Chloratom (grün) des Liganden KH-CB19 und dem Carbonylsauerstoffatom von Glu237 der <i>hinge</i> -Region der CLK3 (PDB: 2WU7)	17
Abbildung 1-15: Struktur der 11 <i>H</i> -Indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäuren 18a-d	21
Abbildung 1-16: Struktur des Fragments 19a , das als Ausgangsverbindung für die Entwicklung neuer Strukturen in dieser Arbeit diente	21
Abbildung 2-1: Kristallstruktur von Harmin (1 , blau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (grau) (PDB: 3ANR).	25
Abbildung 2-2: Kristallstruktur von INDY (10 , grün) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (grau) (PDB: 3ANQ).....	26

Abbildung 2-3: Co-Kristallstruktur von Leucettin L41 (8 , orange) mit DYRK1A (grau) (PDB: 4AZE)	27
Abbildung 2-4: Bindemodus der Verbindung 17 (braun) in der ATP-Bindetasche von DYRK2 (grün) (PDB: 5LXC)	28
Abbildung 2-5: Ergebnisse des <i>redockings</i> der 11 <i>H</i> -Indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäuren ...	30
Abbildung 2-6: Analyse des Bindemodus von KuFal194 (18a , rot) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (blau) (PDB: 4YLJ).....	32
Abbildung 2-7: Analyse der Bindungsgeometrie einer möglichen Halogenbindung zwischen dem Halogensubstituenten in Position 10 der Verbindungen 18e , 18f und 18a und dem Carbonylsauerstoff von Leu241 der <i>hinge</i> -Region.....	33
Abbildung 2-8: Wasservermittelte Halogenbindung zwischen dem 10-Iodsubstituenten von KuFal194 und DYRK1A.....	34
Abbildung 2-9:Möglicher Bindemodus des Fragments 19a (orange) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (blau, PDB: 4YLJ)	35
Abbildung 2-10: Dockingergebnisse der 7-halogenierten Verbindungen 19a–c im Vergleich	36
Abbildung 2-11: Struktur der <i>N</i> -substituierten Verbindungen 20a und 20b	36
Abbildung 2-12: Ergebnis der <i>docking</i> -Experimente mit der <i>N</i> -methylierten Verbindung 20a	37
Abbildung 2-13: Überlagerte Darstellung der zwei verschiedenen Posen von 20b in der Bindetasche von DYRK1A (blau).....	37
Abbildung 2-14: Oberflächendarstellung der beiden möglichen Orientierungen von 20b in der ATP-Bindestelle	38
Abbildung 2-15: Ergebnisse der <i>docking</i> -Studien mit den 2-Phenylverbindungen 19d–f	40
Abbildung 2-16: Oberflächendarstellung der <i>docking</i> -Pose der Verbindung 19g mit einem <i>p</i> -Methoxyphenylsubstituenten in Position 2 des Indols.....	41
Abbildung 2-17: <i>docking</i> -Posen der Verbindung 19h in der ATP-Bindetasche von DYRK1A...	42
Abbildung 2-18: <i>docking</i> -Posen der Verbindungen 19i–k mit aliphatischen Resten an Position 2.....	43
Abbildung 2-19: Bindemodus der Verbindung 21 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	44
Abbildung 2-20: Ergebnis des <i>dockings</i> von der Verbindung 19f (grün) in die ATP-Bindetasche von DYRK1B (A, orange) und CLK1 (B, olivgrün, PDB: 2VAG).....	45
Abbildung 3-1: ¹ H-NMR-Spektrum der Carbonsäure 44a	61

Abbildung 3-2: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren der Säure 44a und des Nitrils 19d	62
Abbildung 3-3: FT-IR-Spektren der Verbindungen 19d und 44a	63
Abbildung 3-4: Ausschnitt aus dem ^1H - ^1H -COSY-Spektrum der Verbindung 21	66
Abbildung 3-5: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 21	67
Abbildung 3-6: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 21 nach Durchführung des H/D-Tausches	68
Abbildung 4-1: Möglicher Bindemodus der Verbindung 19n (orange) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (blau, PDB: 4YLJ) und GSK-3 β (grün, PDB: 5OY4)	71
Abbildung 4-2: Mögliche Orientierung der Verbindungen 19q (A) und 19p (B) in der Bindetasche von DYRK1A (blau, PDB: 4YLJ)	73
Abbildung 4-3: Vorhergesagter Bindemodus des 2-(4-Hydroxyphenyl)-Derivats 19v (orange) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (blau)	74
Abbildung 4-4: Analyse der <i>docking</i> -Pose von 19f (orange) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (PDB: 4YLJ, blau)	79
Abbildung 4-5: Hemmung der endogenen DYRK1A-Aktivität in HeLa-Zellen durch die Verbindungen 19d (KuRoM025), 19f (KuRoM039) und 19i (KuRoM118)	82
Abbildung 4-6: Hemmung der Zellproliferation der genannten Krebszelllinien durch die <i>N</i> - methylierte Verbindung 20f	84
Abbildung 5-1: Auswertung der nephelometrischen Bestimmung der kinetischen Löslichkeit von 19b	91

9.3 Schemataverzeichnis

Schema 3-1: Darstellung der 2-Chlor-1-(2-aminophenyl)ethan-1-one 24 aus 2-substituierten Anilinen 22 und Chloracetonitril (23) in einer Sugawara-Reaktion	46
Schema 3-2: Mechanismus der regioselektiven Reaktion von Anilinen mit organischen Nitrilen. Modifiziert nach DOUGLAS <i>et al.</i> ¹¹⁶	47
Schema 3-3: Synthese der 2-substituierten Indole 29 in einer Grignard-Reaktion ausgehend von den Verbindungen 24	48
Schema 3-4: Synthese von 7-Iod-2-(pyridin-3-yl)-1 <i>H</i> -indol (29o)	50
Schema 3-5: Postulierter Mechanismus zur Erklärung der Regioselektivität der Reaktion von 24 mit den Grignard-Verbindungen 28 zur Bildung von 2-substituierten Indolen 29	50

Schema 3-6: Darstellung der <i>N</i> -substituierten Indole 35a–f und der <i>N</i> -substituierten Indol-3-carbonitrile 20g–k	52
Schema 3-7: Übersicht über die drei verschiedenen Methoden, die zur Einführung der Nitrilgruppe an Position 3 der 2-substituierten Indole 29 und der unsubstituierten Indole 34 angewandt wurden.	53
Schema 3-8: Synthese der Indol-3-carbonitrile 19 nach einer zweistufigen Methode mit den 2-Oxoessigsäurederivaten 36 als isolierten Intermediaten	54
Schema 3-9: Möglicher Mechanismus der Bildung der Nitrile 19 aus den 2-Oxocarbonsäuren 36 mit einem Oxim als Zwischenstufe nach FALKE ¹¹⁸ und BORSCHÉ ¹¹⁹	55
Schema 3-10: Darstellung von NCTS (37) aus <i>N</i> -Phenylharnstoff (40) und Tosylchlorid (41). ..	55
Schema 3-11: Synthese der Indol-3-carbonitrile 19 und der <i>N</i> -substituierten Verbindungen 20 nach Methode B mit dem Reagenz NCTS (37)	56
Schema 3-12: Einführung der Nitrilgruppe nach Methode C mit Chlorsulfonylisocyanat (38).	57
Schema 3-13: Von LOHAUS entwickelter Mechanismus der Nitrilbildung aus <i>N</i> -Chlorsulfonylcarbonsäureamiden. ¹²³	58
Schema 3-14: Unerwünschte Bildung der Indol-3-carbonsäuren 44 bei der Umsetzung der Indole 29a und 35e mit Chlorsulfonylisocyanat	60
Schema 3-15: Synthese der Phenole 19u–v ausgehend von 19h bzw. 29f	64
Schema 3-16: Darstellung des Diols 21 durch <i>cis</i> -Dihydroxylierung der Allylseitenkette der Verbindung 19l	65
Schema 3-17: Mechanismus der Dihydroxylierung der Allylseitenkette von 19l durch Osmiumtetroxid über die cyclische Zwischenstufe 45	65

10 Literaturverzeichnis

- 1 Kumar, A., Singh, A., Ekavali, M.: A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol. Rep.* **2015**, 67, 195–203.
- 2 Price, M.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Prina, M.; Ali, G.-C.; Wu, Y.-T. (Hg.): The global impact of dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. World Alzheimer Report 2015 of *Alzheimer's Disease International (ADI)*, London **2015**.
- 3 <http://www.alzheimer-europe.org/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia/Prevalence-of-dementia-in-Europe>, abgerufen am 10.08.2017.
- 4 Stotani, S., Giordanetto, F., Medda, F.: DYRK1A inhibition as potential treatment for Alzheimer's disease. *Future Med. Chem.* **2016**, 8, 681–696.
- 5 Wolfe, M. S. (H.): Alzheimer's Disease II, Springer International Publishing, Cham **2017**, S. 4-6.
- 6 Adeniji, A. O., Adams, P. W., Mody, V. V.: Amyloid β hypothesis in the development of therapeutic agents for Alzheimer's disease. Adejare, A. (Hg.): Drug discovery approaches for the treatment of neurodegenerative diseases, Academic Press (Elsevier), Amsterdam **2017**, S. 109-143.
- 7 Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., Gleichmann, M.: An overview of APP processing enzymes and products. *NeuroMol. Med.* **2010**, 12, 1–12.
- 8 Morishima-Kawashima, M., Ihara, Y.: Alzheimer's disease: beta-amyloid protein and tau. *J. Neurosci. Res.* **2002**, 70, 392–401.
- 9 Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., Grundke-Iqbal, I.: Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* **2010**, 7, 656–664.
- 10 Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Peña-Ortega, F.: Tau Proteins. Adejare, A. (Hg.): Drug discovery approaches for the treatment of neurodegenerative diseases, Academic Press (Elsevier), Amsterdam **2017**, S. 145-160.
- 11 Tell, V., Hilgeroth, A.: Recent developments of protein kinase inhibitors as potential AD therapeutics. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, 7, 189.

- 12 Lovestone, S., Boada, M., Dubois, B., Hüll, M., Rinne, J. O., Huppertz, H.-J., Calero, M., Andrés, M. V., Gómez-Carrillo, B., León, T., del Ser, T.: A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2015**, 45, 75–88.
- 13 del Ser, T., Steinwachs, K. C., Gertz, H. J., Andrés, M. V., Gómez-Carrillo, B., Medina, M., Vericat, J. A., Redondo, P., Fleet, D., León, T.: Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, 33, 205–215.
- 14 Costa, A. C. S., Scott-McKean, J. J.: Prospects for improving brain function in individuals with Down syndrome. *CNS Drugs* **2013**, 27, 679–702.
- 15 Park, J., Chung, K. C.: New perspectives of Dyrk1A role in neurogenesis and neuropathologic features of Down syndrome. *Exp. Neurobiol.* **2013**, 22, 244–248.
- 16 Antonarakis, S. E., Lyle, R., Dermitzakis, E. T., Reymond, A., Deutsch, S.: Chromosome 21 and down syndrome. From genomics to pathophysiology. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, 5, 725–738.
- 17 Becker, W., Soppa, U., Tejedor, F. J.: DYRK1A: A potential drug target for multiple Down syndrome neuropathologies. *CNS Neurol. Disord.: Drug targets* **2014**, 13, 26–33.
- 18 Lee, N.-C., Chien, Y.-H., Hwu, W.-L.: A review of biomarkers for Alzheimer's disease in down syndrome. *Neurol. Ther.* **2017**, 6, 69–81.
- 19 Castro, P., Zaman, S., Holland, A.: Alzheimer's disease in people with Down's syndrome. The prospects for and the challenges of developing preventative treatments. *J. Neurol.* **2017**, 264, 804–813.
- 20 Head, E., Powell, D., Gold, B. T., Schmitt, F. A.: Alzheimer's disease in down syndrome. *Eur. J. Neurodegener. Dis.* **2012**, 1, 353–364.
- 21 Head, E., Silverman, W., Patterson, D., Lott, I. T.: Aging and down syndrome. *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* **2012**, 2012, 412536.
- 22 Wegiel, J., Dowjat, K., Kaczmarek, W., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Mazur Koleccka, B., Wegiel, J., Silverman, W. P., Reisberg, B., DeLeon, M., Wisniewski, T., Gong, C.-X., Liu, F., Adayev, T., Chen-Hwang, M.-C., Hwang, Y.-W.: The role of overex-

- pressed DYRK1A protein in the early onset of neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *Acta Neuropathol.* **2008**, 116, 391–407.
- 23 Grant, S. K.: Therapeutic protein kinase inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 1163–1177.
- 24 Becker, W., Sippl, W.: Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J.* **2011**, 278, 246–256.
- 25 Soundararajan, M., Roos, A. K., Savitsky, P., Filippakopoulos, P., Kettenbach, A. N., Olsen, J. V., Gerber, S. A., Eswaran, J., Knapp, S., Elkins, J. M.: Structures of Down syndrome kinases, DYRKs, reveal mechanisms of kinase activation and substrate recognition. *Structure* **2013**, 21, 986–996.
- 26 Fabbro, D., Cowan-Jacob, S. W., Moebitz, H.: Ten things you should know about protein kinases. IUPHAR Review 14. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, 172, 2675–2700.
- 27 Aranda, S., Laguna, A., La Luna, S. de: DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J.* **2011**, 25, 449–462.
- 28 Fabbro, D.: 25 years of small molecular weight kinase inhibitors: potentials and limitations. *Mol. Pharmacol.* **2015**, 87, 766–775.
- 29 Hanks, S. K., Hunter, T.: Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**, 9, 576–596.
- 30 Becker, W., Joost, H. G.: Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1999**, 62, 1–17.
- 31 Taylor, S. S., Kornev, A. P.: Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, 36, 65–77.
- 32 Cowan-Jacob, S. W., Jahnke, W., Knapp, S.: Novel approaches for targeting kinases. Allosteric inhibition, allosteric activation and pseudokinases. *Future Med. Chem.* **2014**, 6, 541–561.
- 33 Johnson, L. N., Noble, M. E.M., Owen, D. J.: Active and inactive protein kinases. Structural basis for regulation. *Cell* **1996**, 85, 149–158.

- 34 Adayev, T., Chen-Hwang, M.-C., Murakami, N., Lee, E., Bolton, D. C., Hwang, Y.-W.: Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A does not require tyrosine phosphorylation for activity in vitro. *Biochemistry* **2007**, *46*, 7614–7624.
- 35 Himpel, S., Panzer, P., Eirnbter, K., Czajkowska, H., Sayed, M., Packman, L. C., Blundell, T., Kentrup, H., Grötzinger, J., Joost, H.-G., Becker, W.: Identification of the auto-phosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem. J.* **2001**, *359*, 497–505.
- 36 Alexeeva, M., Åberg, E., Engh, R. A., Rothweiler, U.: The structure of a dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A-PKC412 complex reveals disulfide-bridge formation with the anomalous catalytic loop HRD(HCD) cysteine. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2015**, *71*, 1207–1215.
- 37 Becker, W., Weber, Y., Wetzel, K., Eirnbter, K., Tejedor, F. J., Joost, H.-G.: Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25893–25902.
- 38 Tejedor, F. J., Hämmerle, B.: MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development. *FEBS J.* **2011**, *278*, 223–235.
- 39 Altafaj, X.: Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Human Molecular Genetics* **2001**, *10*, 1915–1923.
- 40 Wegiel, J., Gong, C.-X., Hwang, Y.-W.: The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. *FEBS J.* **2011**, *278*, 236–245.
- 41 Duchon, A., Herault, Y.: DYRK1A, a dosage-sensitive gene involved in neurodevelopmental disorders, is a target for drug development in down syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* **2016**, *10*, 104.
- 42 Abbassi, R., Johns, T. G., Kassiou, M., Munoz, L.: DYRK1A in neurodegeneration and cancer: Molecular basis and clinical implications. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *151*, 87–98.
- 43 Evers, J. M. G., Laskowski, R. A., Bertolli, M., Clayton-Smith, J., Deshpande, C., Eason, J., Elmslie, F., Flinter, F., Gardiner, C., Hurst, J. A., Kingston, H., Kini, U., Lampe, A. K., Lim, D., Male, A., Naik, S., Parker, M. J., Price, S., Robert, L., Sarkar, A., Straub, V.,

- Woods, G., Thornton, J. M., Wright, C. F.: Structural analysis of pathogenic mutations in the DYRK1A gene in patients with developmental disorders. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, 26, 519–526.
- 44 Luco, S. M., Pohl, D., Sell, E., Wagner, J. D., Dymont, D. A., Daoud, H.: Case report of novel DYRK1A mutations in 2 individuals with syndromic intellectual disability and a review of the literature. *BMC medical genetics* **2016**, 17, 15.
- 45 van Bon, B. W. M., Hoischen, A., Hehir-Kwa, J., Brouwer, A. P. M. de, Ruivenkamp, C., Gijsbers, A. C. J., Marcelis, C. L., Leeuw, N. de, Veltman, J. A., Brunner, H. G., Vries, B. B. A. de: Intragenic deletion in DYRK1A leads to mental retardation and primary microcephaly. *Clinical genetics* **2011**, 79, 296–299.
- 46 Park, J., Song, W.-J., Chung, K. C.: Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 3235–3240.
- 47 Liu, F., Liang, Z., Wegiel, J., Hwang, Y.-W., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Ramakrishna, N., Gong, C.-X.: Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J.* **2008**, 22, 3224–3233.
- 48 Ryoo, S.-R., Jeong, H. K., Radnaabazar, C., Yoo, J.-J., Cho, H.-J., Lee, H.-W., Kim, I.-S., Cheon, Y.-H., Ahn, Y. S., Chung, S.-H., Song, W.-J.: DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 34850–34857.
- 49 Jung, M.-S., Park, J.-H., Ryu, Y. S., Choi, S.-H., Yoon, S.-H., Kwen, M.-Y., Oh, J. Y., Song, W.-J., Chung, S.-H.: Regulation of RCAN1 protein activity by Dyrk1A protein-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 40401–40412.
- 50 Smith, B., Medda, F., Gokhale, V., Dunckley, T., Hulme, C.: Recent advances in the design, synthesis, and biological evaluation of selective DYRK1A inhibitors: a new avenue for a disease modifying treatment of Alzheimer's? *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, 3, 857–872.
- 51 Shi, J., Zhang, T., Zhou, C., Chohan, M. O., Gu, X., Wegiel, J., Zhou, J., Hwang, Y.-W., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Gong, C.-X., Liu, F.: Increased dosage of Dyrk1A alters alternative splicing factor (ASF)-regulated alternative splicing of tau in down syndrome. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 28660–28669.

- 52 Ryoo, S.-R., Cho, H.-J., Lee, H.-W., Jeong, H. K., Radnaabazar, C., Kim, Y.-S., Kim, M.-J., Son, M.-Y., Seo, H., Chung, S.-H., Song, W.-J.: Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 1333–1344.
- 53 Ryu, Y. S., Park, S. Y., Jung, M.-S., Yoon, S.-H., Kwen, M.-Y., Lee, S.-Y., Choi, S.-H., Radnaabazar, C., Kim, M.-K., Kim, H., Kim, K., Song, W.-J., Chung, S.-H.: Dyrk1A-mediated phosphorylation of Presenilin 1: a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2010**, *115*, 574–584.
- 54 Kimura, R., Kamino, K., Yamamoto, M., Nuripa, A., Kida, T., Kazui, H., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Yamagata, H., Tabara, Y., Miki, T., Akatsu, H., Kosaka, K., Funakoshi, E., Nishitomi, K., Sakaguchi, G., Kato, A., Hattori, H., Uema, T., Takeda, M.: The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 15–23.
- 55 Dirice, E., Walpita, D., Vetere, A., Meier, B. C., Kahraman, S., Hu, J., Dančík, V., Burns, S. M., Gilbert, T. J., Olson, D. E., Clemons, P. A., Kulkarni, R. N., Wagner, B. K.: Inhibition of DYRK1A stimulates human β -cell proliferation. *Diabetes* **2016**, *65*, 1660–1671.
- 56 Belgardt, B.-F., Lammert, E.: DYRK1A: A promising drug target for islet transplant-based diabetes therapies. *Diabetes* **2016**, *65*, 1496–1498.
- 57 Wang, P., Alvarez-Perez, J.-C., Felsenfeld, D. P., Liu, H., Sivendran, S., Bender, A., Kumar, A., Sanchez, R., Scott, D. K., Garcia-Ocana, A., Stewart, A. F.: A high-throughput chemical screen reveals that harmine-mediated inhibition of DYRK1A increases human pancreatic beta cell replication. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 383–388.
- 58 Fernández-Martínez, P., Zahonero, C., Sánchez-Gómez, P.: DYRK1A. The double-edged kinase as a protagonist in cell growth and tumorigenesis. *Mol. Cell. Oncol.* **2014**, *2*, e970048.
- 59 Esvan, Y. J., Zeinyeh, W., Boibessot, T., Nauton, L., Thery, V., Knapp, S., Chaikuad, A., Loaec, N., Meijer, L., Anizon, F., Giraud, F., Moreau, P.: Discovery of pyrido[3,4-g]quinazoline derivatives as CMGC family protein kinase inhibitors: Design, synthesis,

- inhibitory potency and X-ray co-crystal structure. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *118*, 170–177.
- 60 Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J Simon C, Alessi, D. R., Cohen, P.: The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* **2007**, *408*, 297–315.
- 61 Göckler, N., Jofre, G., Papadopoulos, C., Soppa, U., Tejedor, F. J., Becker, W.: Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6324–6337.
- 62 Tahtouh, T., Elkins, J. M., Filippakopoulos, P., Soundararajan, M., Burgy, G., Durieu, E., Cochet, C., Schmid, R. S., Lo, D. C., Delhommel, F., Oberholzer, A. E., Pearl, L. H., Carreaux, F., Bazureau, J.-P., Knapp, S., Meijer, L.: Selectivity, cocrystal structures, and neuroprotective properties of leucettines, a family of protein kinase inhibitors derived from the marine sponge alkaloid leucettamine B. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9312–9330.
- 63 Frost, D., Meechoovet, B., Wang, T., Gately, S., Giorgetti, M., Shcherbakova, I., Dunckley, T.: β -carboline compounds, including harmine, inhibit DYRK1A and tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PLoS One* **2011**, *6*, e19264.
- 64 Seifert, A., Allan, L. A., Clarke, P. R.: DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J.* **2008**, *275*, 6268–6280.
- 65 Kim, H., Sablin, S. O., Ramsay, R. R.: Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *337*, 137–142.
- 66 Rüben, K., Wurzlbauer, A., Walte, A., Sippl, W., Bracher, F., Becker, W.: Selectivity profiling and biological activity of novel β -carbolines as potent and selective DYRK1 kinase inhibitors. *PLoS One* **2015**, *10*, e0132453.
- 67 Drung, B., Scholz, C., Barbosa, V. A., Nazari, A., Sarragiotto, M. H., Schmidt, B.: Computational & experimental evaluation of the structure/activity relationship of β -carbolines as DYRK1A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4854–4860.

- 68 Balint, B., Weber, C., Cruzalegui, F., Burbridge, M., Kotschy, A.: Structure-based design and synthesis of harmine derivatives with different selectivity profiles in kinase versus Monoamine Oxidase Inhibition. *ChemMedChem* **2017**, 12, 932–939.
- 69 Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., Cohen, P.: The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* **2003**, 371, 199–204.
- 70 De la Torre, Rafael, Sola, S. de, Pons, M., Duchon, A., de Lagran, María Martínez, Farré, M., Fitó, M., Benejam, B., Langohr, K., Rodriguez, J., Pujadas, M., Bizot, J. C., Cuenca, A., Janel, N., Catuara, S., Covas, M. I., Blehaut, H., Herault, Y., Delabar, J. M., Dierssen, M.: Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, 58, 278–288.
- 71 Neagoie, C., Vedrenne, E., Buron, F., Mérour, J.-Y., Rosca, S., Bourg, S., Lozach, O., Meijer, L., Baldeyrou, B., Lansiaux, A., Routier, S.: Synthesis of chromeno[3,4-*b*]indoles as Lamellarin D analogues: a novel DYRK1A inhibitor class. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 49, 379–396.
- 72 Giraud, F., Alves, G., Debiton, E., Nauton, L., Théry, V., Durieu, E., Ferandin, Y., Lozach, O., Meijer, L., Anizon, F., Pereira, E., Moreau, P.: Synthesis, protein kinase inhibitory potencies, and in vitro antiproliferative activities of meridianin derivatives. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4474–4489.
- 73 Shaw, S. J., Goff, D. A., Lin, N., Singh, R., Li, W., McLaughlin, J., Baltgalvis, K. A., Payan, D. G., Kinsella, T. M.: Developing DYRK inhibitors derived from the meridianins as a means of increasing levels of NFAT in the nucleus. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 2617–2621.
- 74 Debdab, M., Carreaux, F., Renault, S., Soundararajan, M., Fedorov, O., Filippakopoulos, P., Lozach, O., Babault, L., Tahtouh, T., Baratte, B., Ogawa, Y., Hagiwara, M., Eisenreich, A., Rauch, U., Knapp, S., Meijer, L., Bazureau, J.-P.: Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4172–4186.

- 75 Naert, G., Ferré, V., Meunier, J., Keller, E., Malmström, S., Givalois, L., Carreaux, F., Bazureau, J.-P., Maurice, T.: Leucettine L41, a DYRK1A-preferential DYRKs/CLKs inhibitor, prevents memory impairments and neurotoxicity induced by oligomeric A β 25-35 peptide administration in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2015**, 25, 2170–2182.
- 76 Ogawa, Y., Nonaka, Y., Goto, T., Ohnishi, E., Hiramatsu, T., Kii, I., Yoshida, M., Ikura, T., Onogi, H., Shibuya, H., Hosoya, T., Ito, N., Hagiwara, M.: Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.* **2010**, 1, 86.
- 77 Masaki, S., Kii, I., Sumida, Y., Kato-Sumida, T., Ogawa, Y., Ito, N., Nakamura, M., Sonamoto, R., Kataoka, N., Hosoya, T., Hagiwara, M.: Design and synthesis of a potent inhibitor of class 1 DYRK kinases as a suppressor of adipogenesis. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 4434–4441.
- 78 Gourdain, S., Dairou, J., Denhez, C., Bui, L. C., Rodrigues-Lima, F., Janel, N., Delabar, J. M., Cariou, K., Dodd, R. H.: Development of DANDYs, new 3,5-diaryl-7-azaindoles demonstrating potent DYRK1A kinase inhibitory activity. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 9569–9585.
- 79 Zhou, Q.-Q., Phoa, A. F., Abbassi, R. H., Hoque, M., Reekie, T. A., Font, J. S., Ryan, R. M., Stringer, B. W., Day, B. W., Johns, T. G., Munoz, L., Kassiou, M.: Structural optimization and pharmacological evaluation of inhibitors targeting dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases (DYRK) and CDC-like kinases (CLK) in glioblastoma. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 2052–2070.
- 80 Kim, H., Lee, K.-S., Kim, A.-K., Choi, M., Choi, K., Kang, M., Chi, S.-W., Lee, M.-S., Lee, J.-S., Lee, S.-Y., Song, W.-J., Yu, K., Cho, S.: A chemical with proven clinical safety rescues Down-syndrome-related phenotypes in through DYRK1A inhibition. *Disease models & mechanisms* **2016**, 9, 839–848.
- 81 Hulme, C.: Preparation of benzimidazole and imidazopyridine derivatives as inhibitors of DYRK1A and uses thereof. WO2017040993 **2017**.
- 82 Branca, C., Shaw, D. M., Belfiore, R., Gokhale, V., Shaw, A. Y., Foley, C., Smith, B., Hulme, C., Dunckley, T., Meechoovet, B., Caccamo, A., Oddo, S.: Dyrk1 inhibition improves Alzheimer's disease-like pathology. *Aging Cell* **2017**, 16, 1146–1154.

- 83 Chaikuad, A., Diharce, J., Schroder, M., Foucourt, A., Leblond, B., Casagrande, A.-S., Desire, L., Bonnet, P., Knapp, S., Besson, T.: An unusual binding model of the methyl 9-anilinothiazolo[5,4-f]quinazoline-2-carbimidates (EHT 1610 and EHT 5372) confers high selectivity for dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10315–10321.
- 84 Coutadeur, S., Benyamine, H., Delalonde, L., Oliveira, C. de, Leblond, B., Foucourt, A., Besson, T., Casagrande, A.-S., Taverne, T., Girard, A., Pando, M. P., Désiré, L.: A novel DYRK1A (Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. Effect on Tau and amyloid pathologies in vitro. *J. Neurochem.* **2015**, *133*, 440–451.
- 85 Foucourt, A., Hédou, D., Dubouilh-Benard, C., Girard, A., Taverne, T., Casagrande, A.-S., Désiré, L., Leblond, B., Besson, T.: Design and synthesis of thiazolo[5,4-f]quinazolines as DYRK1A inhibitors, part II. *Molecules* **2014**, *19*, 15411–15439.
- 86 Fedorov, O., Huber, K., Eisenreich, A., Filippakopoulos, P., King, O., Bullock, A. N., Szklarczyk, D., Jensen, L. J., Fabbro, D., Trappe, J., Rauch, U., Bracher, F., Knapp, S.: Specific CLK inhibitors from a novel chemotype for regulation of alternative splicing. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 67–76.
- 87 Xu, Z., Yang, Z., Liu, Y., Lu, Y., Chen, K., Zhu, W.: Halogen bond: its role beyond drug-target binding affinity for drug discovery and development. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 69–78.
- 88 Wilcken, R., Zimmermann, M. O., Lange, A., Joerger, A. C., Boeckler, F. M.: Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1363–1388.
- 89 Cavallo, G., Metrangolo, P., Milani, R., Pilati, T., Priimagi, A., Resnati, G., Terraneo, G.: The halogen bond. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2478–2601.
- 90 Zhou, P., Lv, J., Zou, J., Tian, F., Shang, Z.: Halogen-water-hydrogen bridges in biomolecules. *J. Struct. Biol.* **2010**, *169*, 172–182.
- 91 Meanwell, N. A.: Improving drug candidates by design: a focus on physicochemical properties as a means of improving compound disposition and safety. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1420–1456.

- 92 Leeson, P. D., Young, R. J.: Molecular property design: Does everyone get it? *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6, 722–725.
- 93 Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 46, 3–26.
- 94 Leeson, P. D., Springthorpe, B.: The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 6, 881–890.
- 95 Kerns, E. H., Di, L., Carter, G. T.: In vitro solubility assays in drug discovery. *Curr. Drug Metab.* **2008**, 9, 879–885.
- 96 Hopkins, A. L., Keseru, G. M., Leeson, P. D., Rees, D. C., Reynolds, C. H.: The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, 13, 105–121.
- 97 Kerns, E. H., Di, L.: Drug-like properties. Concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization. 1. Auflage, Academic Press (Elsevier), Amsterdam **2008**, S. 56–82.
- 98 Ishikawa, M., Hashimoto, Y.: Improvement in aqueous solubility in small molecule drug discovery programs by disruption of molecular planarity and symmetry. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 1539–1554.
- 99 Jain, N., Yalkowsky, S. H.: Estimation of the aqueous solubility I. Application to organic nonelectrolytes. *J. Pharm. Sci.* **2001**, 90, 234–252.
- 100 Hill, A. P., Young, R. J.: Getting physical in drug discovery: a contemporary perspective on solubility and hydrophobicity. *Drug discovery today* **2010**, 15, 648–655.
- 101 Falke, H.: Neue selektive Hemmstoffe der Proteinkinase DYRK1A. Dissertation Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag, Aachen **2014**, S. 153–158.
- 102 Falke, H., Chaikuad, A., Becker, A., Loaëc, N., Lozach, O., Abu Jhaisha, S., Becker, W., Jones, P. G., Preu, L., Baumann, K., Knapp, S., Meijer, L., Kunick, C.: 10-Iodo-11H-indolo[3,2-c]quinoline-6-carboxylic acids are selective inhibitors of DYRK1A. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 3131–3143.

- 103 Falke, H.: Neue selektive Hemmstoffe der Proteinkinase DYRK1A. Dissertation Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag, Aachen **2014**, S. 167f.
- 104 Rognan, D.: Docking Methods for virtual screening: principles and recent advances. Sotriffer, C. (Hg.): Virtual screening: principles, challenges, and practical guidelines, Wiley-VCH, Weinheim **2011**, S. 153-176.
- 105 Klebe, G.: Wirkstoffdesign. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2009**, S. 310-313.
- 106 Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., Taylor, R.: Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727–748.
- 107 The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC): User Guide. <https://www.ccdc.cam.ac.uk/support-and-resources/ccdcresources/748e2e78b0384715a462f17d38dfff5c.pdf>, abgerufen am 21.12.2017.
- 108 Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V., Mee, R. P.: Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Computer-Aided Mol. Des.* **1997**, 11, 425–445.
- 109 Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., Taylor, R. D.: Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* **2003**, 52, 609–623.
- 110 Sali, A., Blundell, T. L.: Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **1993**, 234, 779–815.
- 111 Pei, T., Chen, C., Dormer, P. G., Davies, I. W.: Expanding the [1,2]-aryl migration to the synthesis of substituted indoles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 4231–4233.
- 112 Pei, T., Tellers, D. M., Streckfuss, E. C., Chen, C., Davies, I. W.: [1,2]-Aryl migration in the synthesis of substituted indoles. Scope, mechanism, and high throughput experimentation. *Tetrahedron* **2009**, 65, 3285–3291.
- 113 Sugasawa, T., Toyoda, T., Adachi, M., Sasakura, K.: Aminohaloborane in organic synthesis. 1. Specific ortho substitution reaction of anilines. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4842–4852.

- 114 Houben, J.: Über die Kern-Kondensation von Phenolen und Phenol-äthern mit Nitrilen zu Phenol- und Phenol-äther-Ketimiden und -Ketonen (I.). *Ber. dtsh. Chem. Ges. A/B* **1926**, *59*, 2878–2891.
- 115 Hoesch, K.: Eine neue Synthese aromatischer Ketone. I. Darstellung einiger Phenolketone. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1915**, *48*, 1122–1133.
- 116 Douglas, A. W., Abramson, N. L., Houpius, I. N., Karady, S., Molina, A., Xavier, L. C., Yasuda, N.: In situ NMR spectroscopic studies of aniline ortho acylation (“sugasawa reaction”). The nature of reaction intermediates and Lewis acid influence on yield. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6807–6810.
- 117 Falke, H.: Neue selektive Hemmstoffe der Proteinkinase DYRK1A. Dissertation Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag, Aachen **2014**, S. 141–144.
- 118 Borsche, W.: Zur Kenntnis der Benzisoxazole. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1912**, *390*, 1–29.
- 119 Yang, Y., Zhang, Y., Wang, J.: Lewis acid catalyzed direct cyanation of indoles and pyrroles with N-cyano-N-phenyl-p-toluenesulfonamide (NCTS). *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5608–5611.
- 120 Anbarasan, P., Neumann, H., Beller, M.: A novel and convenient synthesis of benzonitriles: electrophilic cyanation of aryl and heteroaryl bromides. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 4217–4222.
- 121 Mehta, G., Dhar, D. N., Suri, S. C.: Reaction of indoles with chlorosulphonyl isocyanate; a versatile route to 3-substituted indoles. *Synthesis* **1978**, 374–376.
- 122 Lohaus, G.: Nitrilsynthesen mit Chlorsulfonylisocyanat. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2719–2729.
- 123 Wieking, K., Knockaert, M., Leost, M., Zaharevitz, D. W., Meijer, L., Kunick, C.: Synthesis of paullones with aminoalkyl side chains. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **2002**, *335*, 311–317.
- 124 Huchet, Q. A., Kuhn, B., Wagner, B., Kratochwil, N. A., Fischer, H., Kansy, M., Zimmerli, D., Carreira, E. M., Müller, K.: Fluorination patterning: a study of structural motifs that impact physicochemical properties of relevance to drug discovery. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9041–9060.

- 125 Brückner, R.: Reaktionsmechanismen. 3. Auflage, Springer Spektrum, Berlin **2004**, S. 750-752.
- 126 Henley, Z. A., Bax, B. D., Inglesby, L. M., Champigny, A., Gaines, S., Faulder, P., Le, J., Thomas, D. A., Washio, Y., Baldwin, I. R.: From PIM1 to PI3K δ via GSK3 β . Target hopping through the kinome. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, 8, 1093–1098.
- 127 Bissantz, C., Kuhn, B., Stahl, M.: A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5061–5084.
- 128 Graaf, K. de, Czajkowska, H., Rottmann, S., Packman, L. C., Lilischkis, R., Lüscher, B., Becker, W.: The protein kinase DYRK1A phosphorylates the splicing factor SF3b1/SAP155 at Thr434, a novel in vivo phosphorylation site. *BMC Biochem.* **2006**, 7, 7.
- 129 Jain, P., Karthikeyan, C., Moorthy, N. S., Waiker, D., Jain, A., Trivedi, P.: Human CDC2-like kinase 1 (CLK1). A novel target for Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets* **2014**, 15, 539–550.
- 130 MarvinSketch **2017**, 17.13.0, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
- 131 Hou, T. J., Xia, K., Zhang, W., Xu, X. J.: ADME evaluation in drug discovery. 4. Prediction of aqueous solubility based on atom contribution approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2004**, 44, 266–275.
- 132 Wölfel, S.: Neue Inhibitoren der anaplastic lymphoma kinase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag, Aachen **2014**.
- 133 Bevan, C. D., Lloyd, R. S.: A high-throughput screening method for the determination of aqueous drug solubility using laser nephelometry in microtiter plates. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1781–1787.
- 134 Lovering, F., Bikker, J., Humblet, C.: Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6752–6756.
- 135 Armarego, W. L. F., Chai, C. L. L.: Purification of laboratory chemicals. 5. Auflage, Butterworth-Heinemann (Elsevier), Burlington **2003**, S. 85 f, 198 f, 223, 343, 370.
- 136 Falke, H.: Neue selektive Hemmstoffe der Proteinkinase DYRK1A. Dissertation Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag, Aachen **2014**, S. 325.

- 137 Glennon, R. A., Schubert, E., Jacyno, J. M., Rosecrans, J. A.: Studies on several 7-substituted N,N-dimethyltryptamines. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 1222–1226.
- 138 Tabuchi, S., Ito, H., Sogabe, H., Kuno, M., Kinoshita, T., Tatumi, I., Yamamoto, N., Mitsui, H., Satoh, Y.: Dual CCK-A and CCK-B receptor antagonists (II). Preparation and structure activity relationships of 5-alkyl-9-methyl-1,4-benzodiazepines and discovery of FR208419. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1–15.
- 139 Candito, D. A., Lautens, M.: Exploiting the chemistry of strained rings: synthesis of indoles via domino reaction of aryl iodides with 2H-azirines. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3312–3315.
- 140 La Regina, G., Bai, R., Coluccia, A., Famiglini, V., Pelliccia, S., Passacantilli, S., Mazzocchi, C., Ruggieri, V., Verrico, A., Miele, A., Monti, L., Nalli, M., Alfonsi, R., Di Marcotullio, L., Gulino, A., Ricci, B., Soriani, A., Santoni, A., Caraglia, M., Porto, S., Da Pozzo, E., Martini, C., Brancale, A., Marinelli, L., Novellino, E., Vultaggio, S., Varasi, M., Mercurio, C., Bigogno, C., Dondio, G., Hamel, E., Lavia, P., Silvestri, R.: New indole tubulin assembly inhibitors cause stable arrest of mitotic progression, enhanced stimulation of natural killer cell cytotoxic activity, and repression of hedgehog-dependent cancer. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5789–5807.
- 141 Bansal, R. K., Sharma, S. K.: Reaction of phenacyltriphenylarsonium bromide with anilines. Synthesis of 2-phenylindoles through arsenic ylide. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 1923–1925.
- 142 Islam, S., Larrosa, I.: "On water", phosphine-free palladium-catalyzed room temperature C-H arylation of indoles. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 15093–15096.
- 143 Cuny, G. D., Yuan, J., Jagtap, P., Degterev, A.: Preparation of substituted indolyl-alkyl-imidazole/oxazole inhibitors of cellular necrosis. US 20050119260 **2005**.
- 144 Cho, E. J., Senecal, T. D., Kinzel, T., Zhang, Y., Watson, D. A., Buchwald, S. L.: The palladium-catalyzed trifluoromethylation of aryl chlorides. *Science* **2010**, *328*, 1679–1681.
- 145 Falke, H.: Neue selektive Hemmstoffe der Proteinkinase DYRK1A. Dissertation Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag, Aachen **2014**, S. 324.

- 146 Kurzer, F.: Cyanamides. Part I. The synthesis of substituted arylsulphonylcyanamides. *J. Chem. Soc.* **1949**, 1034–1038.
- 147 Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7 **2015**.
- 148 Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E.: UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605–1612.
- 149 Beauchard, A., Laborie, H., Rouillard, H., Lozach, O., Ferandin, Y., Le Guével, R., Guéhen-Guillouzo, C., Meijer, L., Besson, T., Thiéry, V.: Synthesis and kinase inhibitory activity of novel substituted indigoids. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6257–6263.
- 150 Primot, A., Baratte, B., Gompel, M., Borgne, A., Liabeuf, S., Romette, J. L., Jho, E. H., Costantini, F., Meijer, L.: Purification of GSK-3 by affinity chromatography on immobilized axin. *Protein Expression Purif.* **2000**, 20, 394–404.
- 151 Reinhardt, J., Ferandin, Y., Meijer, L.: Purification of CK1 by affinity chromatography on immobilised axin. *Protein Expression Purif.* **2007**, 54, 101–109.
- 152 Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y. Z., Mandelkow, E. M., Eisenbrand, G., Meijer, L.: Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 251–260.
- 153 Schmidt, C., Karge, B., Misgeld, R., Prokop, A., Franke, R., Brönstrup, M., Ott, I.: Gold(I) NHC complexes. Antiproliferative activity, cellular uptake, inhibition of mammalian and bacterial thioredoxin reductases, and gram-positive directed antibacterial effects. *Chem. - Eur. J.* **2017**, 23, 1869–1880.
- 154 Schmidt, C.: Synthese und bioanalytische Charakterisierung von neuen halogenierten N-heterozyklischen Carben Gold(I) Organometallkomplexen als potentielle Zytostatika und Antibiotika. Dissertation TU Braunschweig **2017**, S. 172–175.
- 155 Klopman, G., Li, J.-Y., Wang, S., Dimayuga, M.: Computer automated log P calculations based on an extended group contribution approach. *J. Chem. Inf. Model.* **1994**, 34, 752–781.

- 156 Viswanadhan, V. N., Ghose, A. K., Revankar, G. R., Robins, R. K.: Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *J. Chem. Inf. Model.* **1989**, 29, 163–172.
- 157 Scientific Databases | SRC, Inc. <https://www.srcinc.com/what-we-do/environmental/scientific-databases.html>, abgerufen am 21.12.2017.

Danksagung

Für die Durchführung der kinaseinhibitorischen Testungen möchte ich mich bei Prof. Dr. Laurent Meijer (ManRos Therapeutics, Roscoff, Frankreich) sowie bei seiner Mitarbeiterin Nadège Loaëc bedanken. Ich bedanke mich außerdem bei Prof. Dr. Walter Becker (Institut für Pharmakologie, RWTH Aachen) sowie Simone Bamberg-Lemper für die angenehme Kooperation und die zellulären Testungen der Verbindungen an DYRK1A.

Für die Möglichkeit der Bestimmung der Zytotoxizität danke ich Prof. Dr. Ingo Ott (Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig) und seinem Arbeitskreis. Insbesondere möchte ich Petra Lippmann für die Durchführung der Testungen und Jessica Wölker für die Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse danken.

Ich danke außerdem Dr. Kerstin Ibrom, Petra Holba Schulz und Gabriele Krafft der NMR-Laboratorien des Instituts für Organische Chemie der TU Braunschweig für die Aufnahme der NMR-Spektren. Mein Danke gilt auch Dr. Ulrich Papke und Cornelia Mlynek der massenspektrometrischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie der TU Braunschweig für die Aufnahme der EI-Massenspektren und die Bestimmungen der Präzisionsmasse.

Ich möchte mich auch bei Sandra Meyer und Petra Reich der analytischen Abteilung des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie für die Aufnahme der IR-Spektren, die Probenvorbereitung für die Aufnahme der NMR-Spektren, die Durchführung der Elementaranalyse und die vielen Einwaagen für die biologischen Testungen und Löslichkeitsuntersuchungen bedanken. Bei Matthias Söchtig und Klaus Hartmann möchte ich mich für den Nachschub an Chemikalien und die Versorgung mit Glasgeräten bedanken. Für die Unterstützung bei technischen Problemen und kleineren Reparaturen danke ich Frank Roes und Eduard Hinz. Robert Hübner danke ich für Pflege der Hardware und Hilfestellung bei PC-Problemen. Daniela Eberle, Britta Thomas und Thomas Hoffmann möchte ich für die Hilfe in allen organisatorischen Dingen danken.

Ganz herzlich danke ich außerdem Dr. Lutz Preu und Dr. Hans-Otto Burmeister für die Betreuung während der Weiterbildung und die ständige Unterstützung. Dr. Lutz Preu danke ich außerdem für die Hilfe bei der Auswertung von NMR-Spektren und seine hilfreichen Ratschläge bei analytischen Problemen.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie für das freundschaftliche Miteinander und eine

schöne Zeit. Insbesondere möchte ich mich aber bei den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern des Arbeitskreises Dr. Anne Meyer, Dr. Hoang Lande, Dr. Laura Schlütke, Dr. Andreas Masch, Dr. Thomas Weidner, Oliver Orban, Markus Immer, Christian Lechner, Mehmet Karatas und Merle Nöhre für die gemeinsame Zeit bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen beteiligten Kollegen für die tolle Zusammenarbeit bei der Betreuung und Organisation des Praktikums des 3. Semesters bedanken.

Ich danke meinen Wahlpflichtstudenten Jana Kötz, Sandra Schweda, Max Blech und Jens Lindhof für die engagierte Mitarbeit im Labor.

Ein herzlicher Dank gebührt auch allen Korrekturlesern.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion bedanken. Tobi danke ich für die ständige Motivation und das Aushalten aller Launen.